

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	5
2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	7
2.1 Generalità.....	7
2.1.1 Classificazione	7
2.2 Distribuzione ed epidemiologia	8
2.3 Fisiologia e Struttura.....	8
2.3.1 Genoma	8
2.4 Fattori di virulenza.....	10
2.4.1 Lipopolisaccaride (LPS).....	10
2.4.2 Proteine di membrana.....	11
2.4.3 Biofilm	11
2.4.4 Quorum sensing.....	12
2.4.5 Flagello e Pili	13
2.4.6 Sistemi di secrezione, enzimi e tossine	13
2.5 Resistenza antimicrobica	15
2.5.1 Resistenza intrinseca	17
2.5.2 Resistenza acquisita.....	19
2.5.3 Resistenza adattativa	20
2.6 Infezioni causate da <i>P. aeruginosa</i>	21
2.6.1 Polmoniti da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.7 Trattamento delle infezioni	27
2.7.1 Nuove strategie terapeutiche	28

3.	CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM.....	30
3.1	Struttura molecolare.....	31
3.2	Meccanismo d'azione	33
3.3	Farmacocinetica e dosaggio.....	33
3.4	Utilizzo nel trattamento delle polmoniti	35
3.5	Effetti collaterali	36
3.6	Resistenza	36
4.	SCOPO DELLO STUDIO	38
5.	MATERIALI E METODI.....	39
5.1	Disegno dello studio	39
6.	ANALISI STATISTICA.....	41
7.	RISULTATI.....	42
7.1	Caratteristiche generali dei pazienti.....	42
7.2	Analisi univariata.....	46
7.3	Analisi multivariata.....	53
8.	CONCLUSIONI.....	54
9.	BIBLIOGRAFIA.....	58

1. INTRODUZIONE

Le patologie di natura infettiva rappresentano ancora oggi una importante causa di morbilità e mortalità nella popolazione mondiale. La WHO (World Health Organization) nella lista delle 10 principali cause di morte nel mondo annovera le infezioni a carico delle basse vie respiratorie al 4° posto. Considerando però unicamente i paesi in via di sviluppo, le polmoniti salgono al 2° posto ed entrano nella classifica anche altre patologie infettive: malaria, tubercolosi, HIV e diarrea (soprattutto di origine infettiva)¹.

A pesare sulla mortalità legata alle malattie di natura infettiva negli ultimi decenni vi è la comparsa e la progressiva diffusione di microrganismi resistenti agli antibiotici.

La resistenza agli antimicrobici è il fenomeno per il quale un microrganismo risulta resistente all'attività di un antibiotico originariamente efficace per il trattamento di infezioni da esso causate. Negli ultimi decenni questo fenomeno ha assunto una rilevanza mondiale tale da indurre la WHO e l'Unione Europea (UE) ad adottare strategie e azioni congiunte atte a contenerlo, primo fra tutti il "Global Action Plan on antimicrobial resistance".

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, l'AMR (antimicrobial resistance) rappresenta oggi una delle maggiori minacce per la salute pubblica a causa dell'impatto economico ed epidemiologico, che si riflette in un aumento della morbosità e della mortalità associate ad infezioni causate da patogeni resistenti rispetto a quelle causate da patogeni sensibili.

L'acquisizione di resistenze è un meccanismo evolutivo innescato dall'introduzione degli antibiotici in ambito clinico umano e veterinario (dove viene utilizzato il 50% degli antibiotici usati globalmente), che ha generato una pressione selettiva favorendo la proliferazione di ceppi resistenti.

In questo scenario è emersa la consapevolezza che il controllo del fenomeno dell'AMR non può prescindere da un approccio "One Health", un modello sanitario basato sull'integrazione di discipline diverse e che si basa sul riconoscimento che la salute umana, la salute animale e la salute dell'ecosistema siano legate.

L'Italia è tra i paesi in Europa con le più alte percentuali di resistenza alle principali classi di antibiotici utilizzate in ambito ospedaliero, secondo quanto rilevato dalla sorveglianza dell'AMR curata dall'ISS (AR-ISS), che si basa su una rete di laboratori ospedalieri di microbiologia clinica che inviano annualmente i dati di sensibilità agli antibiotici.

Le infezioni più rilevanti dal punto di vista clinico sono causate da batteri Gram-positivi come lo *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) ed enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), e da batteri Gram-negativi come *A. baumannii* multi-drug resistant (MDR), *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi, *E. coli* produttore di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e *P. aeruginosa* MDR².

Il fenomeno della resistenza agli antimicrobici aggrava il quadro già preoccupante delle infezioni acquisite in ambiente ospedaliero. L'Organizzazione Mondiale della Sanità afferma infatti che le infezioni nosocomiali rappresentano l'evento avverso più comune tra i pazienti ospedalizzati e determinano un aumento della mortalità e dei costi legati all'ospedalizzazione.

Le unità di terapia intensiva sono i reparti ospedalieri con la più alta prevalenza di infezioni associate all'assistenza sanitaria (Health care-associated infection, HCAI), anche a causa dell'utilizzo di devices invasivi come accessi venosi, cateteri vescicali e tubi endotracheali. Inoltre, è elevata l'incidenza di infezioni da microrganismi resistenti in questi reparti a causa delle severe condizioni cliniche dei pazienti ricoverati e l'utilizzo frequente di antibiotici.

Il rafforzamento delle misure di prevenzione e una corretta gestione della terapia antibiotica, unitamente allo sviluppo di nuove molecole ad azione antimicrobica, rappresentano elementi essenziali per fronteggiare questo problema di salute pubblica di interesse mondiale.

2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.1 Generalità

Lo *Pseudomonas aeruginosa* è un batterio gram-negativo, anaerobico, capace di causare infezioni acute e croniche sia in individui immunocompetenti, sia in quelli immunocompromessi.

La sua predilezione nel causare infezioni in ospiti immunocompromessi, l'antibiotico resistenza e i molteplici meccanismi di difesa rendono il suo trattamento una sfida della medicina moderna³.

Lo *P. aeruginosa* è un microrganismo commensale e ambientale ma, in alcune situazioni, può divenire patogeno rendendosi responsabile di molteplici infezioni (tra le più frequenti tratto urinario, vie respiratorie e batteriemie).

2.1.1 Classificazione

P. aeruginosa appartiene alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*. la quale include bacilli Gram-negativi, mobili, asporigeni, aerobi, raramente anaerobi facoltativi, catalasi ed ossidasi positivi.

Hanno scarse esigenze nutritive e la loro temperatura ottimale per la crescita è di circa 30-37°C ma alcune specie sopravvivono anche a temperature più elevate (40-42°C). Essi sono caratterizzati dalla produzione di pigmenti (di colore blu, verde, giallo, marrone) che diffondono nel terreno di coltura.

Questa famiglia, che appartiene alla classe dei Gammaproteobacteria, comprende diversi generi, tra cui quello di maggior interesse clinico è il genere *Pseudomonas* che include numerose specie, come ad esempio specie patogene per piante o animali, oltre allo *P. aeruginosa*.

2.2 Distribuzione ed epidemiologia

Lo *Pseudomonas aeruginosa* è un batterio ubiquitario in natura, la sua diffusione in diversi tipi di habitat è dovuta alla sua capacità di adattamento e al suo metabolismo versatile. Esso è riscontrabile nel terreno, nell'acqua (come nelle piscine), nella materia organica in disfacimento o nella vegetazione. Può essere inoltre riscontrato in ambiente ospedaliero e in questo caso i principali reservoirs sono rappresentati da cibo, cute, bagni (lavabo e tubo di scarico), ventilatori, dispositivi per l'emodialisi ⁴.

La diffusione tra i pazienti dello *P. aeruginosa* nel setting nosocomiale avviene in particolar modo quando l'igiene delle mani non viene attuata correttamente, favorendo il passaggio dell'organismo da paziente a paziente o dal reservoir al paziente ⁵. Numerosi studi infatti evidenziano che le mani degli operatori sanitari sono contaminate da batteri Gram-negativi (nella maggior parte dei casi da *Enterobacter* spp. Ma anche, in percentuali minori, da *Acinetobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*) ^{6,7,8} e che una corretta antisepsi con soluzioni a base di alcool si è dimostrata efficace in vitro nei confronti della maggior parte di gram-positivi e gram-negativi, inclusi microrganismi multidrug-resistant (con alcune eccezioni come nel caso del *C. difficile* dove sono richieste speciali misure di igiene) ⁹.

2.3 Fisiologia e Struttura

Lo *P. aeruginosa* è un bacillo gram-negativo capsulato delle dimensioni di 0.5-1 micron per 1.5-5 micron che generalmente troviamo disposto in coppie. Presenta flagelli polari che gli conferiscono motilità ed ha un metabolismo ossidativo. In condizioni aerobiche utilizza la glicolisi, con l'ossigeno come accettore finale di elettroni; in condizioni anaerobiche può sopravvivere utilizzando nitrato come accettore finale di elettroni. Produce citocromo-ossidasi e ciò lo differenzia dalle *Enterobacteriaceae*.

2.3.1 Genoma

Il repertorio genetico dello *P. aeruginosa* riflette le sue capacità di adattamento, infatti possiede uno tra i più ampi genomi batterici: con 5570 ORFs (open reading frames) la

complessità genetica raggiunge quella di alcuni eucarioti come *Saccharomyces cerevisiae*. Di tutte le 5570 ORFs, solo 372 costituiscono geni con funzioni dimostrate e codificano per enzimi, fattori di virulenza, sistemi di secrezione e proteine coinvolte nella motilità e nell'adesione. Alcune ORFs (1059) hanno una forte omologia con geni, di cui conosciamo la funzione (presenti in altri organismi) come quelli che codificano per proteine coinvolte nella replicazione del DNA, nella sintesi proteica e della parete cellulare. I restanti ORFs sono quelli a cui può essere associata una probabile funzione sulla base della sequenza di basi ¹⁰.

Lo *P. aeruginosa*, tra tutti i batteri, ha in proporzione il maggior numero di geni regolatori (468 geni) che presumibilmente modulano le caratteristiche biochimiche e l'espressione genica del batterio consentendogli di adattarsi a cambiamenti ambientali.

Possiamo inoltre suddividere il genoma dello *P. aeruginosa* in tre parti in base ai geni codificati:

- CORE GENOME: rappresentato dalle regioni del genoma presenti in tutti i ceppi, costituisce il 90% del patrimonio genetico, contiene la maggioranza dei geni house-keeping e questa area del DNA tende a non subire modificazioni in brevi periodi evolutivi.
- ACCESSORY GENOME: costituito da frammenti di DNA di lunghezza variabile raggruppati in clusters localizzati in determinati loci. Questa parte del DNA ha un'ampia rilevanza clinica, dal momento che i geni inclusi codificano per proteine che costituiscono fattori di virulenza e che contribuiscono a determinare la resistenza ai farmaci (come pompe di efflusso, β lattamasi).
- PAN-GENOMA: può essere rappresentato da un cromosoma circolare con segmenti ceppo-specifici. Comprende geni che rientrano nel core genome e nell'accessory genome ed in aggiunta i geni specifici di ogni ceppo batterico. ¹¹

Le dimensioni del genoma e la sua complessità riflettono gli adattamenti evolutivi che gli hanno permesso di crescere e svilupparsi in diversi habitat, come la capacità di trasportare e metabolizzare sostanze organiche, la presenza di sistemi di uptake del ferro e la capacità di eliminare sostanze come antibiotici, grazie a proteine secretorie.

2.4 Fattori di virulenza

I fattori di virulenza sono caratteristiche proprie di un microrganismo che ne definiscono la patogenicità, cioè la capacità di causare malattia. Essi conferiscono al patogeno la capacità di produrre sostanze tossiche e di invadere i tessuti dell'ospite superando le barriere difensive dell'organismo.

2.4.1 Lipopolisaccaride (LPS)

La membrana esterna dello *P. aeruginosa* è costituita da un doppio strato asimmetrico: uno strato interno composto prevalentemente da fosfolipidi e uno strato esterno composto da lipopolisaccaride (LPS). Quest'ultimo è formato da 3 domini:

- il lipide A, un glicolipide idrofobico che media l'endotossicità determinando una risposta iperinflammatoria mediata dai macrofagi.¹² È una molecola essenziale anche per la formazione delle vescicole di membrana esterna (OMV) durante il quorum sensing grazie all'interazione con un chinolone del Pqs (*Pseudomonas* quinolone signal).¹³
- l'antigene O o OPS (O-polisaccaride, il quale differisce nei vari sierogruppi di *P. aeruginosa*), che è una molecola costituita da una catena di polisaccaridi lineari o ramificati, altamente variabile e immunogenico. Dal momento che questa regione si estende all'esterno della membrana, svolge un ruolo cruciale nella patogenesi delle infezioni e nell'interazione del batterio con l'ospite attraverso diversi meccanismi: (a) previene l'uccisione del batterio inibendo la deposizione di pori di membrana e la fagocitosi¹⁴, (b) protegge dallo stress ossidativo e (c) probabilmente partecipa alla NETosi, cioè a quel processo dinamico che porta alla formazione delle "neutrophil extracellular traps".¹⁵
- un core oligosaccaridico la cui composizione varia tra le diverse specie di Gram-negativi e contribuisce a garantire stabilità di membrana.

L'Lps, per l'esposizione sulla superficie batterica, ha un ruolo primario nella patogenicità e nel provocare quindi una risposta nell'ospite, essendo un potente attivatore della risposta immunitaria innata. Questa molecola viene infatti riconosciuta da diversi recettori cellulari dell'ospite come toll-like receptors (TLRs), pattern recognition receptors (PRRs) e NOD-

like receptors che attivano a livello intracellulare pathway molecolari legate alla formazione dell'inflamosoma con l'effetto finale di produrre citochine pro infiammatorie (tra le principali TNF α e IL-1 β). Inoltre l'LPS induce la produzione di NF-kB e di IL-8 (citochina pro-infiammatoria) grazie all'attivazione della pathway mediata da TLR4, implicata nella patogenesi nelle infezioni croniche.¹⁶

2.4.2 Proteine di membrana

Tra le proteine di membrana possiamo considerare fattori di virulenza le porine.

Lo *P. aeruginosa* esprime 26 proteine canale che consentono il passaggio di diverse molecole, tra le principali troviamo OprH, OprD, OprF. La porina più rappresentata è OprF, presente in due possibili conformazioni, chiusa o aperta. Essa consente l'ingresso di ioni e zuccheri e l'uscita di nitrati, nitriti e siderofori. Inoltre OprF media l'adesione batterica alle cellule epiteliali dell'alveolo polmonare, l'adesione ad altri batteri per favorire la formazione di colonie, modula l'espressione di sistemi di secrezione (T3SS) e offre protezione dalla distruzione da parte dei macrofagi durante l'infezione acuta.¹⁷

OprH è invece una porina in grado di legarsi alla proteina SP-A del surfactante e alla laminina nelle infezioni delle vie respiratorie. Essa è coinvolta nel trasporto di molecole come amminoacidi e peptidi e nella resistenza agli aminoglicosidi e alle polimixine.¹⁸

Infine la porina OccD1 (appartenente alla superfamiglia OprD che include 19 diverse proteine) è coinvolta nell'ingresso dei carbapenemi, nel trasporto di amminoacidi e peptidi ed è iperespressa nelle vescicole della membrana esterna (OMV) del biofilm.¹⁸

2.4.3 Biofilm

Il biofilm può essere definito come una comunità di microrganismi che rivestono una superficie e che sono immersi in una matrice extracellulare da essi stessi prodotta.

Questa matrice extracellulare (ECM) che protegge i batteri dall'ambiente circostante contiene esopolisaccaridi (EPS), DNA extracellulare (eDNA), RNA, protein e lipidi.^{19,20}

Gli esopolisaccaridi identificati nella matrice del biofilm dello *P. aeruginosa* sono tre:

- PSL. Ha un ruolo importante nella formazione e nel mantenimento del biofilm garantendo forti interazioni intercellulari essenziali nella fase iniziali. Nelle fasi

successive della maturazione del biofilm questa molecola si dispone alla periferia garantendo supporto e favorendo l'espansione alla periferia. Può legarsi inoltre all'e-DNA creando reti di e-DNA-Psl che fungono da supporto strutturale per il biofilm.

21

- PEL. È un componente essenziale per la formazione di membrane a livello dell'interfaccia aria-liquido e sulla superficie esterna del biofilm. Garantisce inoltre protezione dalla penetrazione degli amminoglicosidi.²²
- ALGINATO. È il più studiato tra i polisaccaridi del biofilm e la sua presenza permette di distinguere i biofilm mucoidi, dove esso viene prodotto in grandi quantità, da quelli non mucoidi. Esso è in grado di trattenere all'interno del biofilm nutrienti e acqua, contribuisce alla protezione dalla penetrazione antibiotici e del sistema immunitario dell'ospite,²³ ed ha la capacità di eliminare i radicali liberi rilasciati dai neutrofili.

L'eDNA contenuto nella matrice del biofilm viene probabilmente rilasciato in seguito alla morte batterica, ma viene anche secreto attivamente all'interno di vescicole nel quorum sensing. Questi frammenti di DNA hanno la funzione di mantenere la struttura tridimensionale del biofilm disponendosi sulla superficie dello stesso e quella di garantire l'antibiotico resistenza.

2.4.4 Quorum sensing

Il quorum sensing è un sistema di comunicazione intercellulare mediato da molecole di segnale prodotte da una popolazione batterica, che ha l'effetto di coordinare l'attività dei microrganismi regolando l'espressione genica sulla base della densità della popolazione. La comunicazione tra batteri nel quorum sensing è mediata dalla produzione, in risposta a stimoli ambientali, di piccole molecole segnale che prendono il nome di autoinducers (AI). Nello *P. aeruginosa* ci sono diversi sistemi di quorum sensing: las, rhl, PQS, e IQS (integrated QS) interconnessi tra loro gerarchicamente ed è il sistema las a controllare l'espressione degli altri tre sistemi ponendosi al vertice di questa organizzazione gerarchica. Questo sistema di signalling intercellulare conferisce allo *P. aeruginosa* un vantaggio competitivo e la capacità di adattarsi e rispondere a stress esterni. Esso infatti induce la

formazione del biofilm, regola la produzione di fattori di virulenza ed è responsabile della resistenza agli antibiotici.²⁴

2.4.5 Flagello e Pili

P. aeruginosa ha un singolo flagello polare, il quale garantisce motilità in acqua o in ambienti a bassa viscosità grazie al movimento di rotazione a spirale che compie. Oltre a garantire la chemiotassi, il flagello viene considerato un importante fattore di virulenza poiché una delle proteine che lo compongono (FliC) è in grado di legare sia i gangliosidi presenti sulla superficie delle cellule epiteliali polmonari consentendo l'adesione, sia la proteina SP-A del surfactante^{25,26} mentre la proteina FliD media l'adesione alla mucina MUC1 sull'epitelio respiratorio.

Lo *P. aeruginosa* possiede anche pili di tipo IV, essenziali nelle fasi iniziali dell'infezione dal momento che garantiscono motilità (grazie alla loro capacità di estendersi e retrarsi) e adesione al batterio. Come alcune proteine che compongono il flagello, anche i pili sono in grado di legare molecole presenti sulla superficie delle cellule epiteliali; conferiscono inoltre resistenza alla fagocitosi mediata da SP-A²⁷ e contribuiscono ad attivare la risposta infiammatoria nell'ospite.

2.4.6 Sistemi di secrezione, enzimi e tossine

P. aeruginosa possiede cinque principali sistemi di secrezione (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, T6SS) attraverso i quali è in grado di secernere un'ampia varietà di tossine ed enzimi nel corso di un'infezione.

- T1SS (Type 1 secretion system) è uno dei sistemi di secrezione batterici più semplici, costituito da una proteina ABC (ATP binding cassette) che garantisce energia per il processo di trasporto nella membrana interna e una proteina inserita nella membrana esterna. Esso consente principalmente la secrezione della proteasi alcalina AprA e della proteina HasA che lega il gruppo eme dell'emoglobina garantendo l'acquisizione di ferro da parte del batterio.²⁸
- T2SS è uno dei più versatili sistemi di secrezione utilizzati dai gram-negativi caratterizzato da una struttura complessa alla quale partecipano 10 diverse proteine.

Questo sistema di secrezione ha un ruolo centrale nella patogenesi delle infezioni, in particolare quelle a carico delle vie respiratorie²⁹, grazie alla secrezione di numerose esoproteine: metalloproteasi, fosfolipasi C, endopeptidasi, lipasi, idrolasi, fosfatasi alcalina, stafilolisina, elastasi. Quest'ultima in particolare è in grado di degradare l'elastina, una delle molecole più rappresentate nel polmone ed essenziale a garantirne l'elasticità, ed è in grado di clivare la proteina D del surfactante, coinvolta in numerose funzioni immunitarie come la regolazione della clearance batterica e dell'attività dei macrofagi alveolari.²⁸ Viene secreta dal T2SS anche l'esotossina A, la molecola a maggior tossicità tra i fattori di virulenza dello *P. aeruginosa*. Essa è un'ADP-ribosil-transferasi in grado di legarsi con il dominio N-terminale alla membrana delle cellule dell'ospite e traslocare all'interno della cellula stessa, dove è in grado di interrompere la sintesi proteica inattivando eEF-2 (fattore di elongazione). Inoltre l'esotossina A provoca l'attivazione delle caspasi coinvolte nel processo apoptotico, inibisce la produzione di IL-8, IL-6, TNF α .

- T3SS è un sistema che consente ai microrganismi che ne dispongono di iniettare direttamente nel citosol delle cellule dell'ospite tossine, chiamate effettori. Questo avviene grazie alla formazione di un poro di traslocazione in seguito all'interazione tra la membrana batterica e la membrana dell'ospite. Gli effettori sono quattro: Esotossina S, la cui attività porta all'apoptosi delle cellule dell'ospite e alla distruzione dell'actina del citoscheletro compromettendo l'adesione cellulare; Esotossina U, una fosfolipasi che ha potere citotossico ed è considerata il più potente tra gli effettori; Esotossina T, che ha un'attività simile all'esotossina S ed è in grado quindi di indurre l'apoptosi delle cellule dell'ospite; Esotossina Y, un'adenilato ciclasi che ha la capacità di interagire con i filamenti di actina del citoscheletro causandone la disgregazione.³⁰
- T5SS consente invece la secrezione di proteine associate all'adesione batterica e alla virulenza come esterasi, esoproteasi e molecole simili all'emoagglutinina. Nei Gram-negativi troviamo anche due sottotipi del sistema T5SS: gli Autotrasportatori AT (proteine capaci di autosecrezione, cioè in grado di attraversare le membrane interna ed esterna della molecola grazie alla struttura delle porzioni N terminale e C terminale ed essere rilasciate all'esterno) e i TPS, two-partner secretion (con

meccanismo simile agli AT ad eccezione del fatto che sono presenti due distinte proteine che partecipano al processo).²⁸

- T6SS, uno dei più recenti sistemi di secrezione individuati, caratterizzato da una struttura simile a quella dei batteriofagi che probabilmente inietta gli effettori dentro il citoplasma delle cellule dell'ospite e costituito principalmente dalla proteine Hcp e VgrG.³¹

Tra le molecole prodotte dallo *P.aeruginosa* che possiamo includere tra i fattori di virulenza c'è la piocianina, un pigmento blu che catalizza la produzione di ione superossido (O_2^-) e perossido di idrogeno (H_2O_2) causando stress ossidativo ed infine lisi cellulare. Questo meccanismo di danno cellulare è responsabile, nelle infezioni delle vie respiratorie, della riduzione della funzione ciliare e del declino della funzione polmonare a causa della produzione di radicali liberi dell'ossigeno e dell'attivazione della risposta infiammatoria.³² La pioverdina è invece una molecola capace di legare e trasportare il ferro, e insieme ai sistemi di uptake dell'eme (T1SS) rappresenta una delle strategie utilizzate dal batterio per soddisfare le richieste di ferro.

2.5 Resistenza antimicrobica

La resistenza antimicrobica è un fenomeno di adattamento di alcuni microrganismi, i quali acquisiscono la capacità di sopravvivere e moltiplicarsi anche in presenza di un agente antibatterico che generalmente è in grado di inibire la crescita o uccidere batteri della stessa specie.

Dal momento che molti antibiotici appartengono alla stessa classe di farmaci, la resistenza a uno specifico antimicrobico può portare alla resistenza a tutta la classe di farmaci a cui esso appartiene.

Il fenomeno della resistenza antimicrobica negli ultimi decenni è cresciuto a dismisura divenendo indubbiamente un grande problema di sanità pubblica. È stato stimato infatti che entro il 2050 l'antibiotico-resistenza potrebbe essere responsabile della morte di 10 milioni di persone ogni anno.³³

L'aumento del numero di batteri resistenti riguarda soprattutto le infezioni nosocomiali, e i microrganismi più spesso coinvolti vengono oggi chiamati con l'acronimo "ESKAPE pathogens" che comprende sia Gram-positivi che Gram-negativi: *Enterococcus faecium*,

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp.* Questi batteri causano frequentemente gravi infezioni nosocomiali nei pazienti immunocompromessi e sono caratterizzati da potenti meccanismi di resistenza ai farmaci.³⁴

L'Organizzazione mondiale della sanità (WHO) nel 2015 ha quindi dato vita al “Global Action Plan on antimicrobial resistance”, un progetto che ha lo scopo di affrontare l'emergenza dell'antibiotico resistenza attraverso il conseguimento di cinque obiettivi: (a) l'aumento della consapevolezza e della comprensione del fenomeno attraverso l'educazione e un'adeguata comunicazione; (b) l'ampliamento delle conoscenze grazie alla ricerca e alla sorveglianza; (c) la riduzione dell'incidenza delle infezioni attraverso l'applicazione di misure di prevenzione; (d) l'ottimizzazione dell'utilizzo degli antibiotici; (e) l'aumento degli investimenti per lo sviluppo di nuovi farmaci, strumenti diagnostici e vaccini.³⁵

Nel 2017 l'Organizzazione mondiale della sanità ha pubblicato la prima lista di patogeni resistenti a molteplici antibiotici al fine di guidare e promuovere la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci.³⁶

Il primo gruppo è costituito da microrganismi responsabili di gravi e talvolta letali infezioni nosocomiali (come polmoniti e batteriemie) divenuti resistenti a un'ampia gamma di antimicrobici, inclusi i carbapenemi e le cefalosporine di terza generazione, i migliori farmaci a disposizione per trattare le infezioni da batteri multi-resistenti.

Il secondo e il terzo gruppo di batteri nella lista contengono specie la cui resistenza antimicrobica sta gradualmente aumentando.

Priority 1: CRITICAL

- *Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant
- *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant
- *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant, ESBL-producing

Priority 2: HIGH

- *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant
- *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and resistant
- *Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant
- *Campylobacter spp.*, fluoroquinolone-resistant
- *Salmonellae*, fluoroquinolone-resistant

- *Neisseria gonorrhoeae*, cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

Priority 3: MEDIUM

- *Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible
- *Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant
- *Shigella* spp., fluoroquinolone-resistant

Lo *P. aeruginosa* viene quindi incluso nel primo gruppo di microrganismi, quelli la cui antibiotico-resistenza rappresenta già oggi un pericolo soprattutto per i pazienti ospedalizzati.

Ciò viene confermato dal report pubblicato dall'ECDC (centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie) e dalla WHO dal titolo "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023" in cui viene analizzata la suscettibilità agli antibiotici (carbapenemi, fluorochinoloni, piperacillina/tazobactam) di 13689 isolamenti (risalenti al 2021) di *P. aeruginosa* in 29 paesi europei. Secondo i dati acquisiti, il 31% degli isolamenti è risultato resistente ad almeno una categoria di antimicrobici, mentre il 6,3% ad almeno quattro categorie (carbapenemi, fluorochinoloni, piperacillina/tazobactam e ceftazidime). Inoltre, un report dell'ECDC stima che nel 2020 in Europa si siano verificate 67638 infezioni da *P. aeruginosa* resistente ai carbapenemi e che 3210 morti siano attribuibili allo stesso microrganismo.³⁷

2.5.1 Resistenza intrinseca

La resistenza intrinseca è la capacità di un microrganismo di resistere ad agenti antimicrobici grazie a caratteristiche strutturali e funzionali proprie del batterio. Nello *P. aeruginosa* sono diversi i meccanismi coinvolti in questo tipo di resistenza:

- La ridotta permeabilità della membrana batterica, dovuta principalmente alla diminuita espressione delle porine (come OprD) che rappresentano una delle cause di resistenza ai carbapenemi. Antibiotici come chinoloni e β -lattamici entrano infatti nella cellula attraverso le porine dove sono presenti siti di legame per queste molecole.
- L'espressione di pompe di efflusso, che consentono al microrganismo di eliminare sostanze dannose contribuendo a determinare la resistenza sia intrinseca sia acquisita

in particolare nei confronti di cloramfenicolo, macrolidi, lincosamide, amminoglicosidi. Esse possono essere classificate in cinque famiglie: (a) resistance-nodulation-division (RND), (b) major facilitator superfamily (MFS), (c) la superfamiglia ATP-binding cassette (ABC), (d) small multidrug resistance (SMR), (e) multidrug and toxic compound extrusion (MATE).³⁸ Le pompe di efflusso appartenenti alla famiglia RND svolgono un ruolo chiave nella resistenza agli antibiotici. Esse hanno una struttura tripartita costituita da un trasportatore di membrana nel versante citoplasmatico, una proteina “linker” tra le due membrane (questi due componenti sono chiamati MEX, multidrug efflux) e una proteina canale nella membrana esterna (chiamata Opr). Sono dodici le pompe di efflusso appartenenti a questa famiglia, quattro delle quali sono coinvolte nell’antibiotico resistenza: MexAB-OprM (responsabile dell’efflusso di β -lattamici e chinoloni), MexCD-OprJ (che garantisce l’efflusso dei β lattamici), MexEF-OprN (che elimina i chinoloni) e MexXY-OprM (la quale media l’efflusso degli amminoglicosidi).³⁸ L’iperpressione di alcune di queste pompe di efflusso è stata riscontrata in alcuni ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti. Data la loro rilevanza nel contribuire all’antibiotico-resistenza, gli inibitori delle pompe di efflusso rappresentano una potenziale nuova strategia terapeutica per fronteggiare questo patogeno.

- La sintesi di enzimi che hanno come target alcuni antimicrobici e sono in grado di inattivarli, come la β -lattamasi AmpC. Questo rappresenta uno dei principali meccanismi di resistenza intrinseca, dal momento che molti antibiotici possiedono legami chimici suscettibili ad idrolisi. La β -lattamasi AmpC è un enzima idrolitico in grado di rompere il legame ammidico dell’anello β -lattamico (contenuto quindi in antimicrobici come penicilline o carbapenemi), rendendo inattivo il farmaco. Possiamo dividere le β lattamasi in quattro classi (A, B, C e D) sulla base della sequenza amminoacidica. Alle classi A, C e D appartengono enzimi in grado di idrolizzare i β lattamici grazie al residuo di serina contenuto del sito attivo. Al contrario gli enzimi della classe B sono metalloenzimi che richiedono per l’idrolisi ioni zinco. Alcuni ceppi di *P. aeruginosa* sono in grado di produrre β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), enzimi appartenenti principalmente alla classe A (ad eccezione delle ESBL di tipo OXA che appartengono alla classe D) che conferiscono al batterio un alto grado di resistenza alla maggior parte dei β -lattamici comprese

penicilline, cefalosporine, monobattami. Per superare il problema della resistenza mediata da questi enzimi vengono utilizzati nella pratica clinica gli inibitori delle β lattamasi come l'acido clavulanico, il sulbactam e il tazobactam.

Gli enzimi implicati nella resistenza antimicrobica intrinseca comprendono non solo le β -lattamasi, ma anche enzimi responsabili dell'inattivazione degli amminoglicosidi: amminoglicoside-fosfotransferasi (APH), amminoglicoside-acetiltransferasi (AAC) e amminoglicoside-nucleotidiltransferasi (ANT) implicati nella resistenza ad antimicrobici come neomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina.

2.5.2 Resistenza acquisita

La resistenza antimicrobica acquisita è invece il risultato dell'acquisizione di geni esterni attraverso il trasferimento orizzontale o è dovuta a mutazioni cromosomiche.

Le mutazioni genetiche possono determinare la resistenza agli antimicrobici attraverso diversi meccanismi:

- La riduzione dell'uptake dei farmaci, che generalmente avviene attraverso porine che mediano la diffusione di farmaci idrofili. Mutazioni spontanee possono modificare l'espressione o la funzione di porine, riducendo la permeabilità della membrana batterica a questi farmaci.
- La modifica dei target. Un esempio è la modifica del sito target dei chinoloni, i quali hanno come bersaglio la topoisomerasi IV e la DNA girasi e inibiscono la replicazione del DNA. Mutazioni a carico delle due molecole target possono ridurre l'affinità di legame dell'antibiotico. Modifiche a carico dei ribosomi determinano invece resistenza agli amminoglicosidi, dal momento che essi hanno come target la subunità 30s del ribosoma stesso.
- L'iperespressione delle pompe di efflusso, che può essere dovuta a mutazioni a carico di regolatori della trascrizione di geni che codificano per queste proteine. Ad esempio l'iperespressione di MexCD-OprJ dovuta alla mutazione del gene *mexZ* causa resistenza ad amminoglicosidi, β -lattamici e fluorochinoloni.
- La produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici. Alcuni ceppi di *P. aeruginosa* infatti iperesprimono le β -lattamasi per una mutazione con guadagno di funzione al

gene inducibile AmpC o per mutazioni con perdita di funzione al gene AmpD che agisce riducendo l'espressione di AmpC.

La resistenza antimicrobica può essere acquisita anche grazie al trasferimento orizzontale di geni di resistenza, trasportati da plasmidi, trasposoni, integroni (elementi genetici trasponibili che si inseriscono nel cromosoma batterico) e profagi (costituiti dal genoma di un batteriofago lisogeno integrato nel cromosoma di un batterio ospite), da parte di microrganismi della stessa specie o di specie differenti. Il trasferimento orizzontale di geni può includere diversi meccanismi: la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione. Il trasferimento orizzontale di geni di resistenza gioca un ruolo cruciale nella disseminazione dell'antibiotico resistenza anche tra batteri di specie diverse.

Sono stati riportati trasferimenti di geni di resistenza a β -lattamici e aminoglicosidi nello *P. aeruginosa*. Tra questi abbiamo, ad esempio, sei tipi di metallo- β -lattamasi, appartenenti alla classe B e trasportate da elementi genetici come integroni e plasmidi: imipenemasi (IMP), Verona integron-encoded metallo β -lattamasi (VIM), Sao Paulo metallo β -lattamasi (SPM), Germany imipenemasi (GIM), New Delhi metallo β -lattamasi (NDM) e Florence imipenemasi (FIM).

2.5.3 Resistenza adattativa

La resistenza adattativa è un tipo di resistenza inducibile che interviene in risposta alla presenza di antibiotici o ad altri stimoli ambientali come ad esempio la variazione del pH, della temperatura, della concentrazione di ossigeno o la riduzioni dei fattori nutritivi. Essa rappresenta quindi un meccanismo che garantisce adattabilità del batterio ai cambiamenti nell'ambiente circostante. Al contrario, la resistenza intrinseca e quella acquisita sono caratterizzate da un fenotipo irreversibile, e sono indipendenti dalla presenza o meno dell'antibiotico nell'ambiente.

Nello *P. aeruginosa* i principali meccanismi di resistenza adattativa sono la generazione di cellule persistenti e la formazione del biofilm.

Le cellule contenute nel biofilm sono meno sensibili infatti all'azione dei farmaci e del sistema immunitario dell'ospite,³⁹ anche batteri con una bassa resistenza intrinseca o senza mutazioni protettive possono divenire meno suscettibili all'azione dell'antibiotico quando crescono all'interno di un biofilm. Inoltre, quando un batterio perde la protezione del

biofilm, la sua sensibilità agli antimicrobici viene ripristinata, ciò suggerisce che la resistenza mediata dal biofilm è indipendente dalle mutazioni genetiche.

I meccanismi coinvolti nella resistenza adattativa mediata dal biofilm includono: la prevenzione della penetrazione dell'antibiotico, l'alterazione del microambiente che riduce la velocità di crescita dei batteri presenti, l'induzione di una risposta adattativa e la differenziazione delle cellule persistenti. I microrganismi che crescono all'interno del biofilm vanno incontro inoltre a molti cambiamenti funzionali e fenotipici, come ad esempio l'aumento della produzione di alginato, la perdita del flagello (dopo le fasi iniziali di formazione del biofilm dove svolge un ruolo essenziale) che riduce l'attivazione del sistema immunitario dell'ospite ed evita la fagocitosi.⁴⁰

Le cellule persistenti sono invece cellule in grado di sopravvivere nonostante alte concentrazioni di antibiotici, nonostante esse non abbiano acquisito geni di resistenza. Esse rappresentano circa l'1% di tutte le cellule contenute nel biofilm e sono caratterizzate da una lenta crescita, dall'essere metabolicamente inattive, come quiescenti, e tolleranti agli antibiotici. Le cellule persistenti possono quindi ripopolare il biofilm quando le concentrazioni dell'antibiotico, dopo il trattamento, diminuiscono, riprendendo la loro crescita e proliferando. Sono quindi responsabili della cronicizzazione di alcune infezioni.

2.6 Infezioni causate da *P. aeruginosa*

Lo *P. aeruginosa* è un patogeno opportunisto responsabile di infezioni acute e croniche a carico di diversi organi e tessuti. I pazienti ad alto rischio di sviluppare un'infezione da parte questo microrganismo sono gli immunocompromessi e i neutropenici, i pazienti con fibrosi cistica e BPCO e soprattutto i pazienti che necessitano di ventilazione invasiva.

Cute e tessuti molli: Lo *P. aeruginosa* causa diverse infezioni primitive a carico di cute e tessuti molli, in particolare nei pazienti ustionati, nei quali è frequente la colonizzazione dell'ustione con conseguente danno vascolare, necrosi tissutale e batteriemia.

Una comune infezione causata da *P. aeruginosa* è la follicolite, generalmente conseguente al contatto con acqua contaminata (ad esempio quella di vasche e piscine) o secondaria alla presenza di acne.

Tra le infezioni di cute e tessuti molli includiamo anche l'ectima gangrenoso, che si manifesta con aree ulcerate di circa 1 cm di diametro localizzate nell'area ascellare, inguinale e perineale e che può correlarsi a batteriemia.

Vie urinarie: Infezioni a carico del tratto urinario sono osservabili principalmente in pazienti con catetere vescicale a permanenza, i quali vanno frequentemente incontro a trattamenti antibiotici con il risultato di selezionare ceppi resistenti di *P. aeruginosa*. Sono inoltre interessati da queste infezioni pazienti con litiasi delle vie urinarie, con prostatite o pazienti sottoposti a procedure invasive.

Infezioni oculari: Generalmente si verificano in seguito a traumi alla cornea, come abrasioni dovute alle lenti a contatto o strofinamento dell'occhio, seguiti dal contatto con acqua contaminata dal batterio e, in conseguenza dell'infezione, possono svilupparsi ulcere corneali.

Otiti: Tra le infezioni più frequenti causate da *P. aeruginosa* in ambito comunitario ci sono le otiti esterne. Il nuoto rappresenta il principale fattore di rischio per queste infezioni che vengono trattate generalmente con antibiotici topici. In alcuni individui anziani e diabetici, *P. aeruginosa* può essere responsabile dell'otite esterna maligna, una rara infezione invasiva necrotizzante a carico del condotto uditivo esterno che può diffondere alla base cranica.

Endocarditi: L'endocardite causata da *P. aeruginosa* è una rara infezione che si verifica prevalentemente in soggetti che fanno uso di droghe endovena e che tende ad avere un'evoluzione cronica e a coinvolgere spesso la valvola tricuspide.

2.6.1 Polmoniti da *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa è un patogeno frequentemente associato ad infezioni delle vie aeree, soprattutto in ambiente ospedaliero, con manifestazioni cliniche di diversa gravità che spaziano da una colonizzazione asintomatica alla polmonite necrotizzante. Generalmente sono coinvolti pazienti con gravi comorbidità: immunocompromessi, pazienti con HIV,

neutropenici, pazienti con danno alla mucosa delle vie respiratorie, con fibrosi cistica o pazienti che necessitano di ventilazione meccanica.

Community-acquired pneumonia (CAP)

P. aeruginosa è un patogeno che raramente causa infezioni acute a carico delle vie respiratorie in ambito comunitario. Nella gran parte dei casi esse riguardano pazienti affetti da patologie croniche come la broncopneumopatia cronico ostruttiva e sottoposti a frequenti trattamenti antibiotici. In questa tipologia di pazienti il 6% circa delle CAP sono causate da *P. aeruginosa*.

Nei soggetti senza comorbidità invece, infezioni respiratorie da parte del medesimo patogeno possono essere causate dall'esposizione ad aerosol provenienti da acque contaminate o possono essere conseguenti a indagini invasive come la broncoscopia.

Le infezioni croniche invece riguardano principalmente i pazienti affetti da fibrosi cistica, una patologia a trasmissione autosomica recessiva causata dalla mutazione del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, il quale codifica per un gene implicato nel trasporto del cloro. Ad essere interessate dalla patologia sono le ghiandole esocrine, le quali nei pazienti affetti producono grandi quantità di secreto vischioso, che progressivamente ostruisce il lume ghiandolare. I principali apparati coinvolti in questa patologia sono quello gastrointestinale (sono frequenti le pancreatiti, la fibrosi epatica dovuta a stasi biliare, l'occlusione intestinale e l'ileo da meconio nel neonato) e quello respiratorio (l'ostruzione bronchiale causa infezioni che cronicizzano ed esitano in bronchiectasie ed insufficienza respiratoria).

Nei pazienti affetti da fibrosi cistica, le infezioni croniche causate dallo *P. aeruginosa* rappresentano la principale causa di mortalità e morbidità. Tra i fattori che ne contribuiscono lo sviluppo, la capacità dello *P. aeruginosa* di formare biofilm ha un ruolo fondamentale. Ad essere identificato frequentemente nei pazienti affetti da CF è infatti il ceppo mucoide di *P. aeruginosa*, in grado di produrre grandi quantità di alginato, il quale è l'esopolisaccaride principale del biofilm ed è in grado di ridurre la clearance polmonare.

Hospital-acquired pneumonia (HAP)

La HAP, o polmonite nosocomiale, è un'infezione del parenchima polmonare insorta ad almeno 48/72h dal ricovero ospedaliero e differisce per eziologia dalle polmoniti comunitarie. Essa rappresenta la seconda più comune infezione acquisita in ambiente nosocomiale e la principale causa di morte per infezioni nosocomiali nei pazienti critici. Coinvolge prevalentemente pazienti anziani, chirurgici o immunocompromessi determinando un aumento dei giorni di degenza e di conseguenza dei costi di assistenza sanitaria dei pazienti.

La HAP si distingue dalla CAP anche per l'eziologia. I batteri associati alle polmoniti nosocomiali sono nella maggior parte dei casi rappresentati da *S. aureus* (MSSA o MRSA), *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.*. In una quota minore di casi vengono riscontrati *Serratia spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* e patogeni associati alle CAP come *H. influenzae*.⁴¹

Il National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) nei recenti report sulle infezioni ospedaliere e il loro trattamento antibiotico evidenzia come lo *P. aeruginosa* risulti essere responsabile del 15% delle polmoniti nosocomiali.⁴²

Ventilator-associated pneumonia (VAP)

Tra le polmoniti nosocomiali possiamo identificare le polmoniti associate al ventilatore (VAP) che si verificano in pazienti ventilati meccanicamente da almeno 48h e secondo il National Healthcare Safety Network (NHSN), costituiscono il 7-32% delle infezioni ospedaliere.⁴² Le VAP sono al primo posto tra le infezioni acquisite nelle ICU (Intensive Care Unit), quindi nei pazienti critici, cioè pazienti che presentano disfunzione di organi vitali e che necessitano di alta intensità di cure. Sono generalmente causate da un singolo batterio, nonostante siano in aumento le infezioni polimicrobiche, ed il più comune patogeno a determinare le VAP è lo *S. aureus* (28.4%), mentre al secondo posto troviamo lo *P. aeruginosa* (26.6%).⁴³

Generalmente, negli individui immunocompetenti, sono molteplici i meccanismi che garantiscono difesa dalle infezioni a carico delle vie respiratorie. Il tratto aerodigestivo al di sopra delle corde vocali è fisiologicamente colonizzato da batteri, mentre le basse vie respiratorie, a meno che non sia in atto un'infezione, è fisiologicamente sterile. I principali meccanismi di difesa sono rappresentati dal riflesso della tosse, dal muco e dalla clearance

mucociliare, che garantisce l'eliminazione di microbi e particolato entrati nelle vie respiratorie. A valle dei bronchioli terminali inoltre, un ruolo centrale nel prevenire infezioni è svolto dai macrofagi alveolari e leucociti i quali, grazie anche all'intervento di opsonizzazione di immunoglobuline e complemento, eliminano i microrganismi e producono citochine responsabili dell'attivazione della risposta immunitaria fungendo da antigen presenting cells (APC).

Nei pazienti ventilati meccanicamente invece molte delle difese dell'ospite sono compromesse a causa di diversi fattori: la grave patologia e le comorbidità, la malnutrizione che danneggia il corretto funzionamento del sistema immunitario e, primo fra tutti, la presenza del tubo endotracheale che impedisce il riflesso della tosse, danneggia l'epitelio tracheale e garantisce una via d'accesso alle basse vie respiratorie per i microrganismi patogeni. La patogenesi delle VAP è quindi strettamente legata alla compromissione delle difese dell'ospite associata alla continua esposizione delle vie respiratorie a un ampio numero di microrganismi. Il tubo endotracheale offre una superficie di adesione per i batteri che, dopo averlo colonizzato, producono biofilm, aumentando la loro virulenza grazie all'acquisizione di resistenza a farmaci e alle difese dell'ospite.

Le fonti di microrganismi responsabili di VAP sono sia esogene, come acqua contaminata, ma più spesso endogene, come la flora orofaringea o il tratto gastroenterico.

La flora batterica orofaringea nei pazienti non intubati è dominata da streptococchi, *Haemophilus* spp. e batteri anaerobi, mentre i bacilli gram-negativi aerobi sono riscontrati raramente.

Nel corso di una grave malattia, soprattutto nei pazienti ricoverati nelle ICU, la flora batterica orale cambia e risulta essere dominata da bacilli Gram-negativi e *S. aureus*. Questa colonizzazione batterica, favorita dalla ridotta produzione di IgA da parte della mucosa, può essere ridotta grazie all'introduzione nella pratica clinica dell'igiene orale eseguita con soluzioni antisettiche a base di clorexidina, sostanza ad azione battericida (altera la struttura proteica della membrana cellulare aumentandone la permeabilità) con uno spettro d'azione attivo verso Gram-positivi, gram-negativi e miceti.

Un altro reservoir per i microrganismi che causano VAP è l'apparato digerente, in particolare lo stomaco. Mentre negli individui sani solo pochi batteri sono in grado di sopravvivere all'acidità dell'ambiente gastrico, nei pazienti critici la proliferazione di batteri nello stomaco è favorita dall'aumento del pH gastrico dovuto a nutrizione enterale o ad esempio

all'utilizzo di inibitori di pompa o di H₂-antagonisti. Questi microrganismi possono refluire all'esofago ed essere aspirati all'interno delle vie respiratorie causando VAP. È stato però dimostrato che, nonostante la colonizzazione da bacilli gram negativi, questa non rappresenta la fonte primaria per la colonizzazione del tratto respiratorio da parte di batteri patogeni e per lo sviluppo di VAP.⁴⁴

Lo *P. aeruginosa* rappresenta uno dei batteri più frequentemente associati a VAP e ad essere coinvolti sono spesso i ceppi multi-resistenti. Ciò contribuisce a determinare gli alti tassi di mortalità che caratterizzano questo tipo di infezione.

Tra i principali fattori di virulenza dello *P. aeruginosa* elicitati in corso di infezione, la formazione del biofilm ha un ruolo centrale, dal momento che garantisce adesione al substrato (tubo endotracheale e mucosa delle vie respiratorie) e protezione dall'attacco di farmaci e sistema immunitario. La maggior parte dei ceppi individuati in corso di VAP hanno mostrato infatti un'iperproduzione di esopolisaccaridi e anche una bassa attività metabolica, caratteristica che li rende difficili da eradicare.⁴⁵ Le esotossine e gli enzimi come elastasi, fosfolipasi C, proteasi prodotti dallo *P. aeruginosa* e espulsi attraverso specifici sistemi di secrezione sono invece la principale causa del danno polmonare. L'esotossina ExoU, prima fra tutti, è responsabile del danno alle cellule dell'epitelio alveolare, nelle quali viene iniettata, determinando danno di membrana e necrosi cellulare.

La patogenesi del danno polmonare nelle infezioni da *P. aeruginosa* non è mediata solo dal microrganismo stesso, ma anche dal sistema immunitario dell'ospite. Mentre infatti la fagocitosi da parte di neutrofili e macrofagi e la produzione di citochine come TNF α garantiscono la clearance batterica, l'azione di altre citochine come ad esempio IL-1 e IL-18 sembra impedire un'adeguata clearance batterica da parte del sistema immunitario, ma i meccanismi molecolari sono ancora sconosciuti.⁴⁶

La diagnosi di VAP viene sospettata in presenza di febbre, tosse produttiva e peggioramento degli scambi respiratori oltre alla comparsa di nuovi infiltrati all'imaging del torace (RX o TC). È l'esame microbiologico che però conferma la diagnosi e caratterizza il batterio responsabile dell'infezione. Il campione viene ottenuto attraverso l'espettorazione, la broncoaspirazione o effettuando un lavaggio bronco-alveolare (BAL).

L'isolamento del patogeno responsabile dell'infezioni è seguito dall'esecuzione dell'antibiogramma, un esame microbiologico che consente di saggiare la sensibilità del

batterio agli antimicrobici generalmente utilizzati e che guida quindi il medico nella scelta del farmaco da utilizzare.

2.7 Trattamento delle infezioni

Il trattamento delle infezioni causate da *P. aeruginosa* si basa su diversi elementi: il ceppo batterico isolato e il risultato dell'antibiogramma, la localizzazione dell'infezione, le risorse disponibili per il controllo dell'infezione e le condizioni cliniche del paziente.

Le categorie di antimicrobici che possono essere utilizzate nel trattamento sono:

- β -lattamici. Rappresentano i farmaci più frequentemente utilizzati, spesso in associazione con inibitori delle β -lattamasi. Tra le penicilline la piperacillina/tazobactam è indicata nelle HAP e nelle VAP, mentre tra le cefalosporine sono indicate nel trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* quelle di terza o quarta generazione, come ceftazidime e cefepime.

I monobattami come aztreonam rappresentano un'opzione terapeutica nei pazienti allergici alle penicilline e nei casi di documentata resistenza agli altri agenti antimicrobici.

I carbapenemi costituiscono la prima linea di trattamento nelle infezioni da *P. aeruginosa*, sia in monoterapia (meropenem o imipenem tra i più utilizzati) o in associazione con inibitori di β -lattamasi (Meropenem/Vaborbactam e Imipenem/Relebactam) utilizzabili nei ceppi produttori di carbapenemasi poiché inibiscono questi enzimi mediante acetilazione.

- Fluorochinoloni. Quelli attivi nei confronti di *P. aeruginosa* sono la ciprofloxacina, levofloxacina e prulifloxacina. La resistenza a questi farmaci si basa sull'espressione di pompe di efflusso da parte del patogeno.
- Amminoglicosidi. Sono efficaci gentamicina, amikacina e tobramicina, ma tendono ad essere utilizzati solo nelle infezioni gravi causati da un ceppo resistente ad altri antimicrobici di prima linea, a causa dei loro effetti collaterali.
- Polimixine. Il loro utilizzo è dovuto al mancato sviluppo di nuove molecole per l'eradicazione di batteri Gram-negativi MDR (multi-drug resistant). La molecola più spesso utilizzata è la colistina (polimixina E) che viene generalmente utilizzata come terapia di salvataggio, da sola o in associazione ad altre molecole, per il trattamento

delle polmoniti da ceppi multiresistenti. La sua somministrazione può avvenire sia per via endovenosa, che talvolta non garantisce concentrazioni adeguate all'eradicazione a livello polmonare ed è gravata da un'importante nefrotossicità e neurotossicità, sia per via inalatoria, migliore per garantire un'adeguata attività antimicrobica.

Per quanto riguarda invece la polimixina B, somministrabile per via endovenosa, ci sono ancora poche evidenze cliniche che ne suggeriscono l'utilizzo nelle polmoniti da *P. aeruginosa*.⁴⁷

Il progressivo aumento di ceppi multiresistenti di *P. aeruginosa* rende il trattamento delle infezioni spesso una sfida. Le evidenze suggeriscono l'utilizzo di una combinazione di antimicrobici nel trattamento empirico, seguito da una de-escalation della terapia e dall'utilizzo di una monoterapia mirata dopo aver valutato la sensibilità del ceppo microbico. Il trattamento di prima linea, in particolare nel caso delle polmoniti, dovrebbe includere un β -lattamico anti-pseudomonas (piperacillina/tazobactam, ceftazidime, cefepime, o carbapenemi) in associazione ad un altro agente anti-pseudomonas come aminoglicosidi o fluorochinoloni.

Il principio fondamentale nel trattamento di gravi infezioni associate a *P. aeruginosa* è la somministrazione precoce di farmaci mirati. L'utilizzo di una terapia empirica appropriata riduce infatti la mortalità di 3 volte rispetto ai casi in cui la terapia empirica non è adeguata.⁴⁸ Tra i più recenti antibiotici sviluppati e indicati per il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* troviamo: cefiderocol, ceftolozano-tazobactam (che verrà approfondito nel prossimo capitolo), ceftazidime/avibactam e imipenem/cilastatina/relebactam. L'utilizzo di questi farmaci nella terapia empirica o mirata garantisce la precoce somministrazione di un trattamento adeguato, soprattutto nel caso di elevata resistenza, riducendo il rischio di effetti collaterali dati dall'uso in combinazione di antibiotici a maggiore tossicità.⁴⁹

2.7.1 Nuove strategie terapeutiche

A causa della crescente difficoltà nel trattamento delle infezioni da ceppi di *P. aeruginosa* antibiotico resistenti, per lo sviluppo di nuove terapie anti-pseudomonas vengono utilizzate come target molecole che partecipano a determinare la resistenza. Il processo di sviluppo di nuovi farmaci è lento a causa della variabilità e della complessità dei meccanismi di

resistenza la cui patogenesi non è ancora chiara, ma urgente per poter fronteggiare la diffusione di batteri MDR in ambito ospedaliero.

Tra le strategie terapeutiche innovative in studio ci sono:

- Nuovi antibiotici. Ad esempio la plazomicina (un aminoglicoside semi-sintetico che inibisce la sintesi proteica ed è in fase 3 di sperimentazione), l'eravaciclina (una nuova fluorociclina attiva verso Gram-negativi e positivi) o la baxdela, anche chiamata delafloxacin meglumina (un fluorochinolone ad ampio spettro che inibisce la replicazione del DNA, anche questa molecola in fase 3)
- Nanoparticelle utilizzate per veicolare farmaci. Sono state testate per il trasporto di farmaci, di geni o di vaccini. Vi sono diverse tipologie di nanoparticelle come liposomi nanoantibiotici, hydrogel, particelle metalliche o anche magnetiche. Le nanoparticelle sono state studiate per veicolare ad esempio vaccini ed hanno come target T6SS. È promettente anche l'utilizzo delle nanoparticelle che hanno come target il biofilm, uno dei principali meccanismi di resistenza, e che sono in grado di penetrare e degradarlo. Il vantaggio dell'utilizzo della nanotecnologia è la minor citotossicità dei farmaci associata a maggiori benefici.
- Terapia fagica. Vengono utilizzati in questo caso i batteriofagi, virus in grado di aderire alla superficie delle cellule dell'ospite ed iniettare all'interno DNA. Uno dei principali limiti dell'utilizzo di questa tecnica è lo sviluppo di anticorpi che neutralizzano i fagi.
- Gene delivery, che consiste nell'introduzione di materiale genetico (DNA o RNA) nelle cellule dell'ospite per determinarne l'espressione. I vettori possono essere virali (lentivirus o adenovirus) o non virali (elettroporazione, lipidi o polimeri).
- Vaccini, che garantiscono una risposta umorale e cellulo-mediata da parte del sistema immunitario. Tra i principali target dei vaccini in studio c'è l'LPS, ma l'alto tasso di variabilità e di mutazioni rendono difficile lo sviluppo di un vaccino. Anche i flagelli, grazie alla loro forte immunogenicità, o le OMV (outer membrane vesicles) possono rappresentare un target ideale.¹⁶

3. CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM

Il ceftolozano/tazobactam è un farmaco che combina una nuova cefalosporina con una potente attività anti-*Pseudomonas* (ceftolozano) a un inibitore delle β -lattamasi (tazobactam). È stato sviluppato per vincere i meccanismi di resistenza antimicrobica sviluppati da *P. aeruginosa*⁴⁷ ed le indicazioni per il suo utilizzo sono:

- Infezioni complicate del tratto urinario (cUTIs);
- Infezioni intra-addominali complicate;
- Polmoniti batteriche associate al ventilatore (VAP) e le polmoniti nosocomiali (HAP).

L'utilizzo di questa combinazione di molecole nella pratica clinica rappresenta un'importante alternativa all'utilizzo dei carbapenemi, spesso utilizzati come farmaci di prima linea nelle infezioni da *P. aeruginosa*, ma nei confronti dei quali sta aumentando la resistenza.

Questo farmaco viene oggi commercializzato con il nome ZERBAXA® e studi clinici *in vitro* hanno dimostrato la sua efficacia verso i seguenti patogeni:

- Infezioni complicate intra-addominali. Gram-negativi: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positivi: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus salivarius*.
- Infezioni complicate del tratto urinario: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.
- HAP e VAP: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

La sicurezza e tollerabilità di questo farmaco, associate alla sua efficacia dimostrata, lo rendono uno degli antimicrobici essenziali per contrastare la crescita di patogeni ESKAPE resistenti. Nonostante la sua bassa efficacia verso ceppi batterici produttori di carbapenemasi e metallo- β -lattamasi, il ceftolozano/tazobactam ha dimostrato una potente attività anti-

Pseudomonas rispetto agli altri farmaci oggi utilizzati grazie anche all'elevata penetrazione nel sito d'infezione, come l'epitelio alveolare nelle infezioni respiratorie.

Inoltre questo antibiotico è stato proposto come potenziale alternativa all'uso dei carbapenemi per il trattamento delle infezioni da Gram-negativi come le Enterobacteriaceae, in un'ottica di risparmio dei carbapenemi. Questa strategia è mirata al recupero dell'attività dei carbapenemi, infatti un loro uso eccessivo stimola la selezione e la diffusione di carbapenemasi e ciò potrebbe ulteriormente pregiudicare la nostra capacità di trattare le infezioni dovute a ceppi MDR.

3.1 Struttura molecolare

Il ceftolozano (precedentemente chiamato CXA-101 e FR264205) è una nuova cefalosporina ad ampio spettro con attività verso ceppi di *P. aeruginosa* resistenti ad altri β -lattamici, fluorochinoloni, o aminoglicosidi, come ai ceppi MDR (multi-drugs resistant). Ha dimostrato infatti notevole stabilità nei confronti dei numerosi meccanismi di resistenza acquisiti da *P. aeruginosa* (ad esempio l'iperespressione della β -lattamasi AmpC), assenza di cross-resistenza con altri agenti antimicrobici e una bassa propensione all'induzione di resistenza in questo patogeno.⁵⁰ Oltre all'attività nei confronti dello *P. aeruginosa*, il ceftolozano è efficace anche nel trattamento delle infezioni causate da Enterobacteriaceae, ma la sua efficacia può essere compromessa nel caso di ceppi produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) o di carbapenemasi. L'associazione del tazobactam amplia quindi lo spettro del ceftolozano anche ai microrganismi produttori di ESBL.

La struttura molecolare delle cefalosporine è caratterizzata dalla presenza di un nucleo costituito da un anello β -lattamico, l'acido 7-aminocefalosporanico (7-ACA), e un anello diidrotiazinico. La differenza tra le varie molecole incluse in questa categoria di farmaci è data dalle variazioni nelle catene laterali in posizione 3 e 7 del nucleo centrale.

Il ceftolozano (Fig.1) è un'ossimino-cefalosporina ed ha una struttura molto simile a quella della ceftazidima, una cefalosporina di terza generazione ad ampio spettro utilizzata prevalentemente per il trattamento di infezioni delle vie respiratorie, della cute e tessuti molli, del tratto urinario o batteriemie causate da *P. aeruginosa* ed altri batteri Gram-negativi. Queste due molecole differiscono per la catena laterale in posizione 3 dell'anello diidrotiazinico: nella ceftazidima è presente un sostituito piridinico, mentre nel ceftolozano

un sostituito pirazolico e ciò gli conferisce un'elevata affinità per le proteine leganti la penicillina PBP1b, PBP1c, PBP2 e PBP3 e stabilità nei confronti della β -lattamasi AmpC (49).

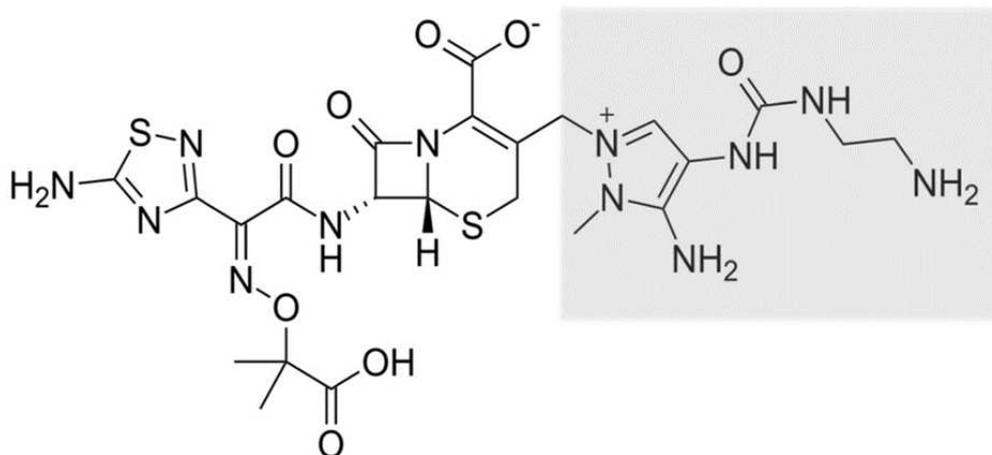


Figura 1. Struttura del ceftolozano

Il *tazobactam* (Fig. 2) è un inibitore delle β -lattamasi derivato del sulbactam, rispetto al quale ha uno spettro d'azione più ampio.

Il sostituito in posizione 1 di questa molecola è in grado di promuovere l'apertura dell'anello nel sito attivo delle β -lattamasi con la conseguente formazione di un legame covalente tra il tazobactam e l'enzima che determina la sua irreversibile inibizione.

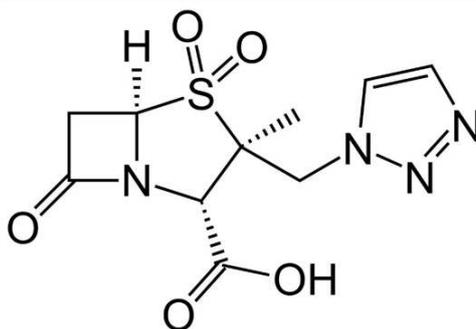


Figura 2. Struttura del tazobactam

3.2 Meccanismo d'azione

I β -lattamici hanno una struttura simile ai substrati delle PBPs (penicillin-binding proteins) e ciò consente loro di legare covalenti questi enzimi a livello del loro sito attivo. L'inibizione delle PBPs impedisce il cross-linking del peptidoglicano (esse partecipano infatti a una delle ultime fasi di formazione del peptidoglicano, principale componente della parete batterica) determinando alterazioni strutturali della parete cellulare e lisi batterica. Le PBPs sono molteplici e ognuna ha una diversa affinità nei confronti dei β -lattamici che è necessario determinare per stabilire l'attività di ogni molecola verso diverse specie batteriche. Nello *P. aeruginosa* i principali target degli antimicrobici sono: PBP1b, PBP1c, PBP2 e PBP3. Il ceftolozano si è dimostrato il più potente inibitore di PBP1b e PBP3, e ha dimostrato avere un'affinità per le principali PBPs di *P. aeruginosa* due volte maggiore rispetto alla ceftazidima.

Il tazobactam è invece un inibitore della gran parte di β -lattamasi di classe A (incluse molte ESBL) ed alcune di classe C (cefalosporinasi). A livello del sito attivo delle β -lattamasi il farmaco forma un complesso stabile che va incontro ad idrolisi molto più lentamente rispetto al complesso formato con i β -lattamici. Il tazobactam va poi incontro a diversi destini: (a) deacilazione del complesso per rigenerare l'enzima attivo e un prodotto inattivo; (2) inattivazione reversibile dell'enzima; (c) formazione di un enzima inattivato irreversibilmente dopo una serie di reazioni.⁵¹

3.3 Farmacocinetica e dosaggio

Dopo la somministrazione del farmaco per via endovenosa, il picco di concentrazione plasmatica viene raggiunto a circa 1 ora dall'inizio dell'infusione. L'emivita del ceftolozano/tazobactam in pazienti adulti è di 2.7 ore e ciò spiega la necessità di somministrare una dose ogni 8 ore.^{52,53}

Il ceftolozano viene eliminato per via renale, così come il tazobactam la cui clearance non viene influenzata dalla co-somministrazione del ceftolozano (a differenza della combinazione con la piperacillina che determina una riduzione della sua clearance).

Il ceftolozano/tazobactam può essere somministrato solo per via endovenosa ed il dosaggio approvato dall'EMA per gli adulti con una stima della clearance della creatinina superiore a

50 ml/min equivale a 1 g di ceftolozano e 500mg di tazobactam ogni 8 ore, ad eccezione delle VAP e HAP dove il dosaggio approvato raggiunge i 2g/1g ogni 8 ore (Fig. 3).

Dal momento che l'eliminazione avviene per via renale, la dose deve necessariamente essere aggiustata in base ai livelli di creatinina (Fig. 4).⁵³

Type of infection	Dose	Frequency	Infusion time	Duration of treatment
Complicated intra-abdominal infection**	1 g ceftolozane / 0.5 g tazobactam	Every 8 hours	1 hour	4-14 days
Complicated urinary tract infection Acute pyelonephritis	1 g ceftolozane / 0.5 g tazobactam	Every 8 hours	1 hour	7 days
Hospital-acquired pneumonia, including ventilator-associated pneumonia***	2 g ceftolozane / 1 g tazobactam	Every 8 hours	1 hour	8-14 days

Figura 3. Dosaggio del ceftolozano/tazobactam

Estimated creatinine clearance (mL/min)*	Complicated intra-abdominal infections, complicated urinary tract infections, and acute pyelonephritis**	Hospital-acquired pneumonia, including ventilator-associated pneumonia**
30 to 50	500 mg ceftolozane / 250 mg tazobactam intravenously every 8 hours	1 g ceftolozane / 0.5 g tazobactam intravenously every 8 hours
15 to 29	250 mg ceftolozane / 125 mg tazobactam intravenously every 8 hours	500 mg ceftolozane / 250 mg tazobactam intravenously every 8 hours
End stage renal disease on haemodialysis	A single loading dose of 500 mg ceftolozane / 250 mg tazobactam followed after 8 hours by a 100 mg ceftolozane / 50 mg tazobactam maintenance dose administered every 8 hours for the remainder of the treatment period (on haemodialysis days, the dose should be administered at the earliest possible time following completion of haemodialysis)	A single loading dose of 1.5 g ceftolozane / 0.75 g tazobactam followed after 8 hours by a 300 mg ceftolozane / 150 mg tazobactam maintenance dose administered every 8 hours for the remainder of the treatment period (on haemodialysis days, the dose should be administered at the earliest possible time following completion of haemodialysis)

Figura 4. Dosaggio del farmaco aggiustato per la clearance della creatinina

3.4 Utilizzo nel trattamento delle polmoniti

L'efficacia di una terapia antibiotica dipende non solo dall'utilizzo di antibiotici attivi verso quel microrganismo, ma anche dal raggiungimento di adeguate concentrazioni nel sito d'infezione. La penetrazione degli antimicrobici nel polmone differisce nel paziente affetto da polmonite (dove è più alta) rispetto al paziente sano, e questa è desumibile grazie alla valutazione delle concentrazioni del farmaco raggiunte nell'ELF (epitelial lining fluid, strato che riveste la superficie alveolare a contatto con l'aria costituito da acqua e molteplici soluti come il surfactante). La concentrazione dell'antibiotico in questo sito è considerata un indicatore in grado di predire l'efficacia clinica e l'appropriatezza di un antimicrobico nel trattamento delle polmoniti. L'ELF rappresenta infatti un modo per stimare la distribuzione degli antibiotici lungo nelle basse vie respiratorie. È stato dimostrato che la concentrazione di ceftolozano/tazobactam nell'ELF, utilizzando una dosaggio di 1g/500mg ogni 8 ore, supera la MIC della maggior parte dei germi Gram-negativi coinvolti nelle polmoniti nosocomiali. Studi microbiologici indicano come la MIC₅₀ e la MIC₉₀ di *P. aeruginosa* valutate per il ceftolozano/tazobactam siano rispettivamente di 1 mg/L e 2 mg/L e la concentrazione del farmaco nell'ELF alle dosi raccomandate è stato dimostrato essere compresa tra 1.71 e 29.6 mg/L.

L'efficacia dei β -lattamici dipende anche dal tempo in cui la concentrazione dell'antibiotico è superiore alla MIC. Per le polmoniti causate da *P. aeruginosa* è stato dimostrato che utilizzando un dosaggio di ceftolozano/tazobactam di 1,5g ogni 8h viene inibita la crescita del 99% dei batteri, dal momento che per oltre il 60% del tempo di intervallo la concentrazione nell'ELF ha superato la MIC.⁵⁴

Il rapporto tra l'AUC (Area Under the Curve, un parametro farmacocinetico che informa circa l'esposizione sistemica dopo somministrazione di una sostanza) del ceftolozano nell'ELF e nel plasma è pari a 0.48, a differenza della piperacillina in cui è pari a 0.26. La concentrazione del tazobactam nell'ELF invece risulta due volte più elevata nella combinazione con la piperacillina rispetto al ceftolozano, ma ciò non ha grande rilevanza nel trattamento delle polmoniti da *P. aeruginosa* (dal momento che il ceftolozano ha una potente attività anti-Pseudomonas e il contributo del tazobactam è minimo) quanto invece nel trattamento delle infezioni polmonari causate da Enterobacteriaceae produttrici di β -lattamasi.⁵⁵

Il ceftolozano/tazobactam in vitro si è dimostrato il β -lattamico più efficace nei confronti di *P. aeruginosa*, anche di ceppi multiresistenti grazie alla sua capacità di evadere i classici meccanismi di resistenza attivi verso gli altri β -lattamici e alla bassa propensione a selezionare ceppi resistenti.⁵⁶

Nella prima review sistematica riguardo l'uso del ceftolozano/tazobactam nelle infezioni polmonari da *P. aeruginosa*⁵⁷ si afferma che l'efficacia clinica nelle infezioni polmonari causate da questo microrganismo raggiunge il 72%, ed è ancora più elevata nel caso di ceppi MDR (83.6%). Ciò conferma che questo farmaco può essere considerato una valida ed essenziale opzione terapeutica nelle infezioni respiratorie da ceppi MDR, XDR di *P. aeruginosa*.

3.5 Effetti collaterali

Il ceftolozano/tazobactam si è generalmente ben tollerato ai dosaggi raccomandati.

I più comuni effetti avversi ($\geq 1/100$ e $< 1/10$) sono rappresentati da nausea, diarrea, stipsi, cefalea, ipotensione o rash, generalmente di bassa o moderata severità. Gli effetti collaterali meno comuni ($\geq 1/1\ 000$ e $< 1/100$) sono invece: dispepsia, gastrite, anemia, dispnea, tachicardia o infezioni come candidosi orofaringea e colite da *C. difficile*. Tra le alterazioni degli esami di laboratorio in seguito alla somministrazione del farmaco la più frequente è l'aumento dei livelli di ALT, AST, fosfatasi alcalina e γ -GT.⁵³

3.6 Resistenza

Studi in vivo e in vitro dimostrano che la resistenza di *P. aeruginosa* al ceftolozano/tazobactam è dovuta a diversi meccanismi. Tra i più importanti troviamo: (a) modifiche strutturali a carico delle β -lattamasi AmpC o mutazioni che determinano la loro iperespressione; (b) mutazioni alla PBP3 target del ceftolozano e aumento dell'espressione di diverse pompe di efflusso che riducono la suscettibilità all'antibiotico; (c) mutazioni acquisite orizzontalmente a carico delle β -lattamasi OXA.

Il ceftolozano/tazobactam non ha inoltre mostrato attività nei confronti di ceppi batterici produttori di metallo- β -lattamasi (MBL) e di carbapenemasi e ha una limitata attività nei confronti delle ESBL.

Per evitare la selezione di ceppi resistenti, alcuni studi hanno stabilito l'efficacia di terapie di combinazione che includano il ceftolozano/tazobactam per il trattamento di ceppi MDR/XDR di *P. aeruginosa*. È stato dimostrato l'effetto additivo che hanno la colistina e il ceftolozano/tazobactam utilizzati in combinazione.⁵⁸ Un altro studio dimostra come l'utilizzo del ceftolozano/tazobactam in combinazione con il meropenem è associato a una maggior riduzione della densità di colonie batteriche e a una riduzione dell'insorgenza di resistenze. Questi risultati dimostrano come una strategia che impiega due β -lattamici e che include il ceftolozano/tazobactam e il meropenem può essere utile nel trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* XDR.⁵⁹

4. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di eseguire una sorveglianza attiva dei pazienti critici affetti da polmonite causata da *Pseudomonas aeruginosa* all'interno dei reparti di terapia intensiva dell'Azienda Ospedaliero - Universitaria delle Marche nel periodo compreso tra Gennaio 2021 e Dicembre 2022. Abbiamo confrontato i pazienti che hanno avuto successo clinico con i pazienti che non lo hanno avuto per valutare quali variabili sono associate ad un outcome negativo.

L'efficacia del trattamento è stata valutata considerando la sopravvivenza a 30 giorni dalla prima coltura positiva e la risposta microbiologica all'infezione (distinta in relapse, persistenza o eradicazione dell'infezione).

5. MATERIALI E METODI

5.1 Disegno dello studio

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo di coorte su tutti i pazienti con età uguale o superiore a 18 anni ricoverati presso i reparti di terapia intensiva dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche da Gennaio 2021 a Dicembre 2022, i cui campioni (broncoaspirato, espettorato, lavaggio bronco-alveolare, tracheoaspirato) sono risultati positivi per la presenza di *P. aeruginosa*.

Le informazioni sono state raccolte consultando le cartelle cliniche e i dati riportati dal Laboratorio Centrale del medesimo nosocomio.

Le variabili legate al paziente, che sono state prese in considerazione, sono stati i dati demografici (età, sesso), la presenza di comorbidità sia considerate singolarmente (diabete, BPCO, tumori ematologici e solidi, epatite cronica, patologia cardiovascolare, neurologica, gastrointestinale, insufficienza renale cronica, HIV, neutropenia, trapianto di organo solido), sia valutate tramite il Charlson Comorbidity Index. Sono state valutate le singole comorbidità insorte in acuto, tra le quali la presentazione con shock settico e l'embolia polmonare e, inoltre, la concomitante infezione da SARS-CoV-2.

Come variabili legate all'ospedalizzazione, oltre l'aver classificato la polmonite in CAP HAP o VAP, abbiamo riportato la presenza o meno di catetere venoso centrale (CVC) e di altri devices (tracheostomia, sondino naso-gastrico, drenaggi, catetere vescicale), l'aver effettuato delle manovre invasive nelle 72 ore precedenti, tra cui la broncoscopia, l'esofagogastroduodenoscopia, la colonscopia, la ventilazione meccanica, la rimozione o la sostituzione dei drenaggi, la CVVH, la somministrazione di terapia steroidea o immunosoppressiva nei 30 giorni precedenti, intervento chirurgico nei 3 mesi precedenti, la presenza di altre infezioni batteriche concomitanti o insorte nei 30 giorni precedenti. Abbiamo inoltre valutato il tipo di presidi utilizzati per la ventilazione: CPAP, maschera Venturi, NIV, intubazione orotracheale e tracheostomia.

Infine, le variabili legate al trattamento antibiotico prese in considerazione in questo studio sono state: aver effettuato una terapia antibiotica nei 30 giorni precedenti l'isolamento di *P. aeruginosa*, aver somministrato una terapia empirica e successivamente una terapia

antibiotica mirata sulla base dell'antibiogramma, aver utilizzato ceftolozano/tazobactam per il trattamento dell'infezione.

I pazienti sono stati valutati al momento del primo isolamento di *P. aeruginosa* ed è stato esaminato l'outcome a 30 giorni. Questo è stato definito negativo se insorgeva morte entro 30 giorni, se si verificava una recidiva o nessuna risposta microbiologica.

6. ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite un software statistico disponibile in commercio (SPSS 20.0; IBM, Armonk, NY, USA).

Le variabili qualitative sono state espresse come frequenza dei casi; per le variabili quantitative è stata calcolata la mediana e il range interquartile.

Le variabili qualitative sono state confrontate all'analisi univariata attraverso il test del chi-quadro e il test di Fisher, mentre per le variabili quantitative sono stati utilizzati il test di Wilcoxon e il Mann-Whitney U test. Sono state considerate statisticamente significative le variabili per cui risultava una $p < 0.05$.

Tali variabili sono state quindi incluse nell'analisi multivariata che è stata condotta attraverso il test di regressione logistica lineare.

7. RISULTATI

7.1 Caratteristiche generali dei pazienti

Nel periodo compreso tra Gennaio 2021 e Dicembre 2022 presso i reparti di terapia intensiva dell'Azienda Ospedaliero – Universitaria delle Marche è stata riscontrata un'infezione da parte di *P. aeruginosa* a carico delle vie respiratorie in 165 pazienti: 119 (72%) di sesso maschile e 46 (28%) di sesso femminile, con una mediana di 62 anni.

118 pazienti presentavano almeno una comorbidità cronica. Le più frequenti sono le patologie cardiovascolari (50%), seguite dalle patologie neurologiche (24%), dal diabete (20%), dalle neoplasie solide (12%), dalle patologie gastrointestinali (10%), dalla BPCO (9%), dalle epatopatie croniche (7%), dall' insufficienza renale cronica (6%), dal trapianto di organo solido (4%) e dalla neutropenia (4%), dalle neoplasie ematologiche (3%) e infine dall'HIV (1%).

Il Charlson Comorbidity Index è risultato maggiore di 3 in 62 pazienti.

Tra le comorbidità acute prese in considerazione la più frequente risulta essere l'embolia polmonare (16%), seguita quindi dallo shock settico (12%).

41 pazienti (25%) sono risultati positivi al tampone per la rilevazione del SARS-CoV-2.

Per quanto riguarda le variabili pre-infezione, il CVC, il catetere vescicale e il sondino nasogastrico erano presenti nella totalità dei pazienti, così come l'utilizzo della ventilazione meccanica. Solo il 46% invece è stato sottoposto al posizionamento di un drenaggio chirurgico, il 32% aveva effettuato procedure endoscopiche nelle precedenti 72 h e il 10% era stato sottoposto a CVVH.

Nei 30 giorni precedenti all'isolamento il 42% dei pazienti aveva effettuato una terapia steroidea, il 4% una terapia immunosoppressiva, mentre i pazienti con anamnesi positiva per interventi chirurgici nei tre mesi precedenti l'infezione sono 71 (43%).

Per quanto riguarda la classificazione delle infezioni polmonari riscontrate nei pazienti inclusi nello studio si osservano:

- 3 pazienti (1%) affetti da CAP
- 6 pazienti (4%) affetti da HAP

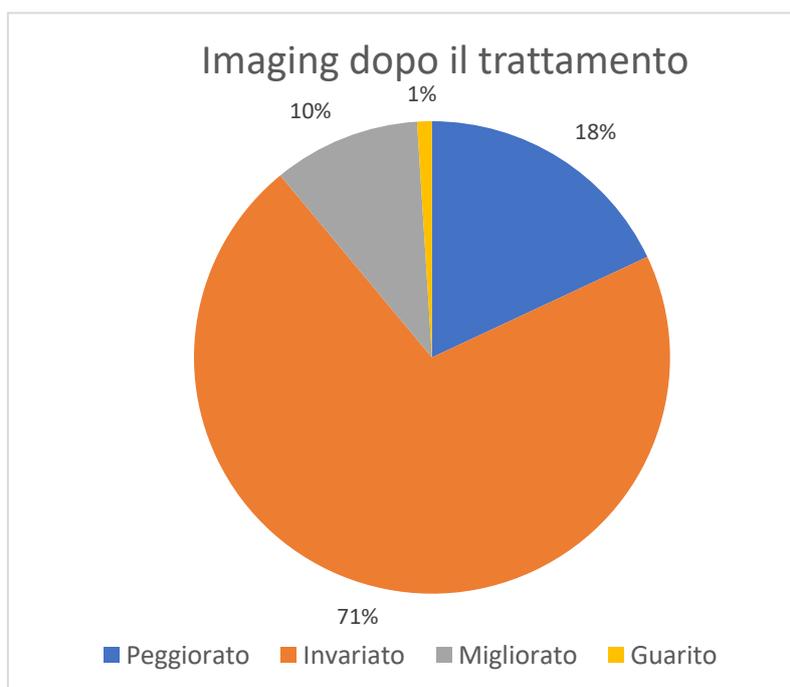
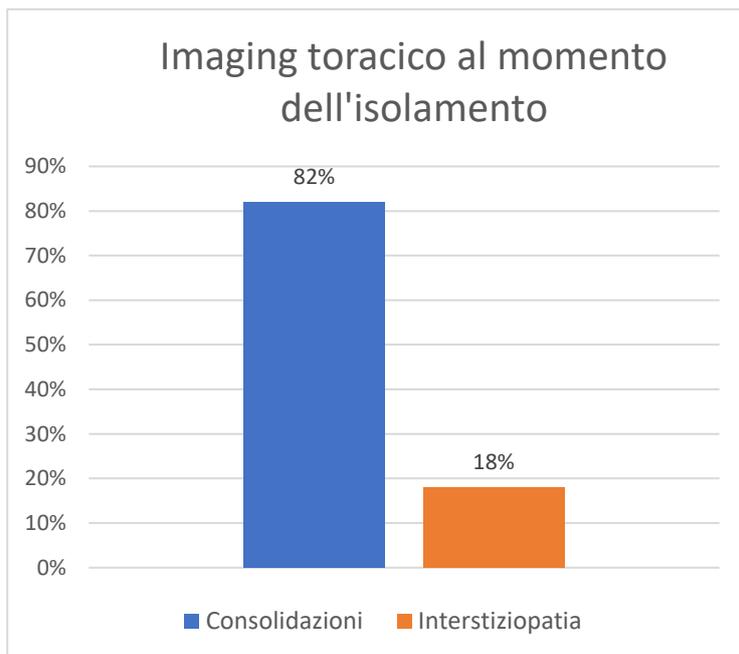
- 157 pazienti (95%) affetti da VAP



Tra i presidi utilizzati per la ventilazione ed a cui sono stati sottoposti i pazienti dello studio osserviamo:

- CPAP, utilizzata nel 19% dei pazienti
- Maschera Venturi, nel 29% dei pazienti
- NIV, nel 14% dei pazienti
- Intubazione oro-tracheale, nel 98% dei pazienti
- Tracheostomia, eseguita nel 67% dei pazienti.

L'imaging mostra nell'82% dei casi la presenza di consolidazioni polmonari, nel 18% dei pazienti invece mostra la presenza di un'interstiziopatia. Al termine del trattamento antibiotico nel 71% dei pazienti l'imaging risulta invariato, nel 18% dei casi peggiorato, nel 10% migliorato e solo nell'1% dei pazienti all'imaging risultano risolti i reperti patologici precedentemente riscontrati.



Nel 55% dei pazienti erano presenti infezioni concomitanti, mentre infezioni precedenti sono state riscontrate nel 58% dei pazienti inclusi nello studio.

La terapia antibiotica ha avuto una durata mediana di 10 giorni. Nel 58% è stata utilizzata una monoterapia mentre nel restante 42% è stata somministrata una politerapia antimicrobica.

Al 76% dei pazienti è stata somministrata inizialmente una terapia empirica, che ha avuto una durata mediana di 3 giorni.

Per il trattamento antimicrobico nel 95% dei casi è stato utilizzato un β -lattamico, mentre al 4% dei pazienti è stato somministrato un antibiotico non appartenente alla classe dei β -lattamici.

La terapia ha incluso l'utilizzo del Ceftolozano/Tazobactam nel 16% dei pazienti, mentre è stata utilizzata la combinazione Ceftazidime/Avibactam nel 30% dei pazienti.

7.2 Analisi univariata

	Total (165)	Succesfull clinical outcome (110)	Clinical failure (50)	P
Variables				
Patients variables				
Sex, n° (%)				
• Male	119 (72%)	81 (74%)	38 (69%)	0.667
• Female	46 (28%)	29 (27%)	17 (31%)	
Age (years), mean (IQR)	63 (50-73)	62.5 (50-72.25)	63 (50-73)	0.968
Charlsons CI >3, n° (%)	62 (38%)	38 (35%)	24 (44%)	0.334
Comorbidities, n° (%)				
• Diabetes	33 (20%)	19 (17%)	14 (26%)	0.302
• BPCO	15 (9%)	9 (12%)	6 (11%)	0.774
• Ematological malign	5 (3%)	4 (4%)	1 (2%)	0.666
• Solid tumors	19 (12%)	13 (12%)	6 (11%)	0.863
• Chronic Hepatitis	12 (7%)	7 (6%)	5 (9%)	0.573
• CV Dis	83 (50%)	51 (46%)	32 (58%)	0.205
• Neurological dis	39 (24%)	27 (25%)	12 (22%)	0.697
• CRI	9 (6%)	4 (4%)	5 (9%)	0.162
• HIV	1 (1%)	1 (1%)	0	1
• Neutropenia	7 (4%)	4 (4%)	3 (6%)	0.687
• GI dis	17 (10%)	11 (10%)	6 (11%)	0.856
• SOT	6 (4%)	3 (3%)	3 (6%)	0.401
Acute comorbidities, n° (%)?	45 (27%)	22 (20%)	23 (42%)	0.006
• Septic shock	20 (12%)	8 (7%)	12 (22%)	0.007
• Pulmonary embolism	25 (15%)	14 (14%)	11 (20%)	0.181
COVID, n° (%)	41 (25%)	19 (17%)	22 (41%)	0.001
Bacteremia, n° (%)	6 (4%)	2 (2%)	4 (7%)	0.098
Hospitalization variables				
CAP, n° (%)	3 (2%)	1 (1%)	2 (4%)	0.258
HAP, n° (%)	6 (4%)	3 (3%)	3 (6%)	0.401
VAP, n° (%)	157 (95%)	106 (96%)	51 (93%)	0.443
Long of stay, mean (IQR)	24 (15-33.5)	9 (5-17)	12 (5-18)	0.362
Pre-infection variables				
Surgical drainage, n° (%)	75 (46%)	49 (45%)	26 (47%)	0.740
Endoscopy, n° (%)	52 (32%)	32 (29%)	20 (36%)	0.343
CVVH, n° (%)	16 (10%)	8 (7%)	8 (15%)	0.137
Steroid therapy, n° (%)	68 (42%)	38 (35%)	30 (56%)	0.012
Immunosuppressive therapy, n° (%)	6 (4%)	4(4%)	2 (4%)	1
Previous Surgery, n° (%)	71 (43%)	54 (49%)	17 (31%)	0.026
Microbiologic variables				
Other infections, n° (%)				
• Previous infections	95 (58%)	64 (58%)	31 (56%)	0.824
• Concomitant	90 (55%)	61 (56%)	29 (53%)	0.740
Days of antibiotic therapy, (median)	10 (7-13)	10 (7-13)	10 (7-13)	0.515
Monotherapy, n° (%)	96 (58%)	64 (58%)	32 (58%)	1
Empiric therapy, n° (%)	126 (76%)	89 (81%)	37 (67%)	0.052
Days of empiric therapy, median (IQR)	3 (2-6)	4 (2-7)	2 (2-4.25)	0.013
Previous therapy, n° (%)	113 (72%)	78 (74%)	35 (70%)	0.640

Targeted therapy	38 (30%)	30 (34%)	8 (21%)	0.154
Therapy with Ceftazidime/avibactam, n° (%)	49 (30%)	32 (29%)	17 (31%)	0.810
Therapy with Ceftolozane/tazobactam, n° (%)	27 (16%)	21 (19%)	6 (11%)	0.181
Type of ventilation, n° (%)				
• O2 venturi	47 (29%)	35 (32%)	12 (22%)	0.180
• CPAP	32 (19%)	16 (15%)	16 (29%)	0.026
• NIV	23 (14%)	16 (15%)	7 (13%)	0.751
• IOT	162 (98%)	107 (97%)	55 (100%)	0.551
• tracheostomy	111 (67%)	77 (70%)	34 (62%)	0.291
Imaging, n° (%)				
• consolidation	133 (82%)	92 (85%)	41 (75%)	0.097
• interstitiopathy	30 (18%)	16 (15%)	14 (25%)	
Imaging at the end of therapy, n° (%)				
• resolved	2 (1%)	2 (2%)	0	0.012
• healed	15 (10%)	14 (14%)	1 (2%)	
• unchanged	111 (71%)	75 (72%)	36 (69%)	
• worsened	28 (18%)	13 (13%)	15 (29%)	

Tabella 1. Analisi univariata pazienti affetti da polmonite da *P. aeruginosa*

Di tutti i 165 pazienti con campione positivo per la presenza di *P. aeruginosa* ricoverati nei reparti di terapia intensiva, 55 (67%) sono andati incontro a fallimento clinico, definito come morte a 30 giorni e/o recidiva o persistenza dell'infezione. 26 di questi hanno presentato un relapse dell'infezione e 31 sono deceduti entro i 30 giorni.

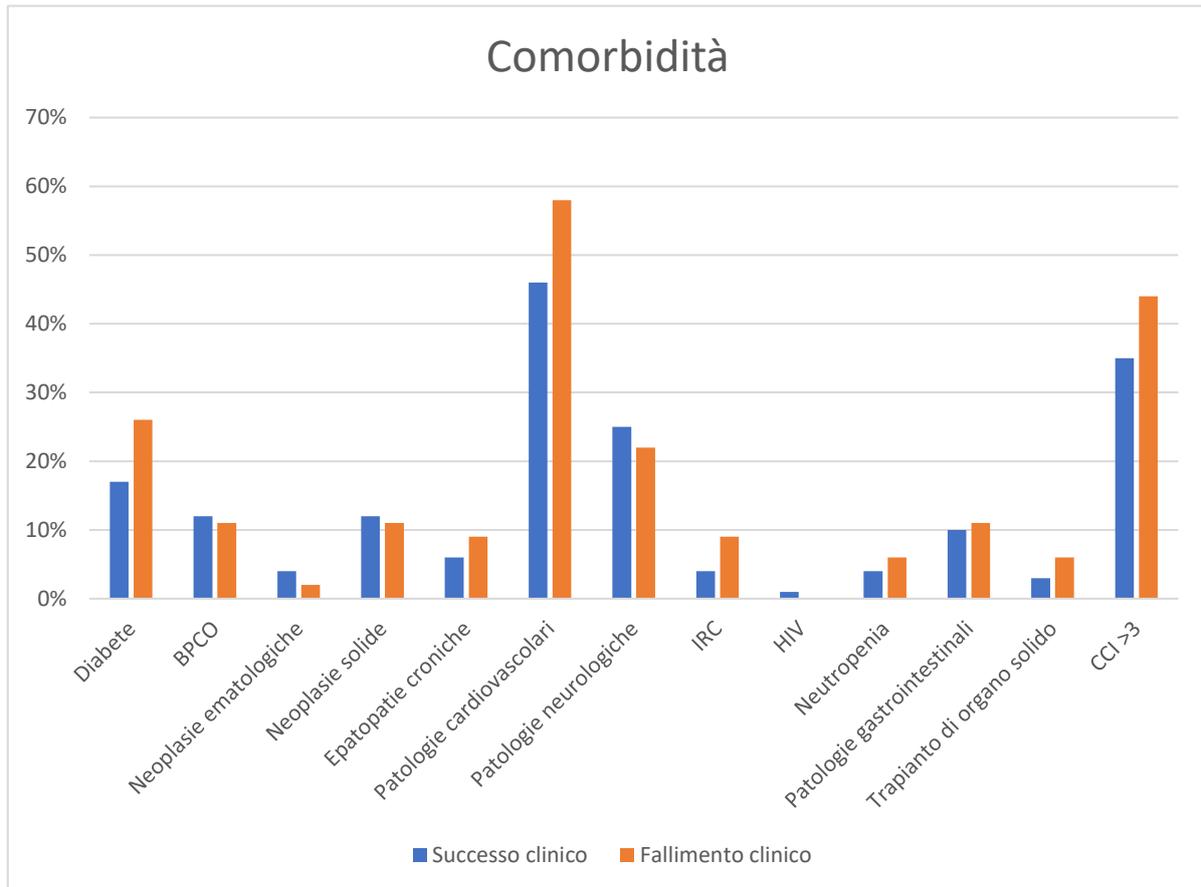
La mediana d'età dei pazienti con outcome negativo è di 63 anni, pari a quella della popolazione generale inclusa nello studio.

Per quanto concerne la variabile riferita al sesso dei pazienti, dei pazienti con outcome positivo il 74% è di sesso maschile, il 26% di sesso femminile. Tra i pazienti con fallimento clinico invece il 69% è di sesso maschile, mentre il 31% di sesso femminile. Questi risultati riflettono il rapporto tra individui di sesso maschile e di sesso femminile della popolazione presa in esame, rispettivamente 72% e 28%.

Tra le comorbidità croniche, nessuna delle variabili è risultata statisticamente significativa, tuttavia tra i pazienti con fallimento clinico della terapia le più frequenti sono state le patologie cardiovascolari, presenti nel 58% dei pazienti con outcome negativo e nel 46% di quelli con successo terapeutico. Il diabete era presente rispettivamente nel 26% e 17%, le patologie neurologiche nel 22% e 25%, la BPCO e le neoplasie solide nell'11% dei pazienti con fallimento terapeutico e nel 12% dei pazienti con successo terapeutico, le patologie gastrointestinali rispettivamente nell'11% e 10%, l'insufficienza renale cronica nel 9% e 4%, la neutropenia nel 6% e 4%, le epatopatie croniche rispettivamente nel 9% e 6%. Infine il

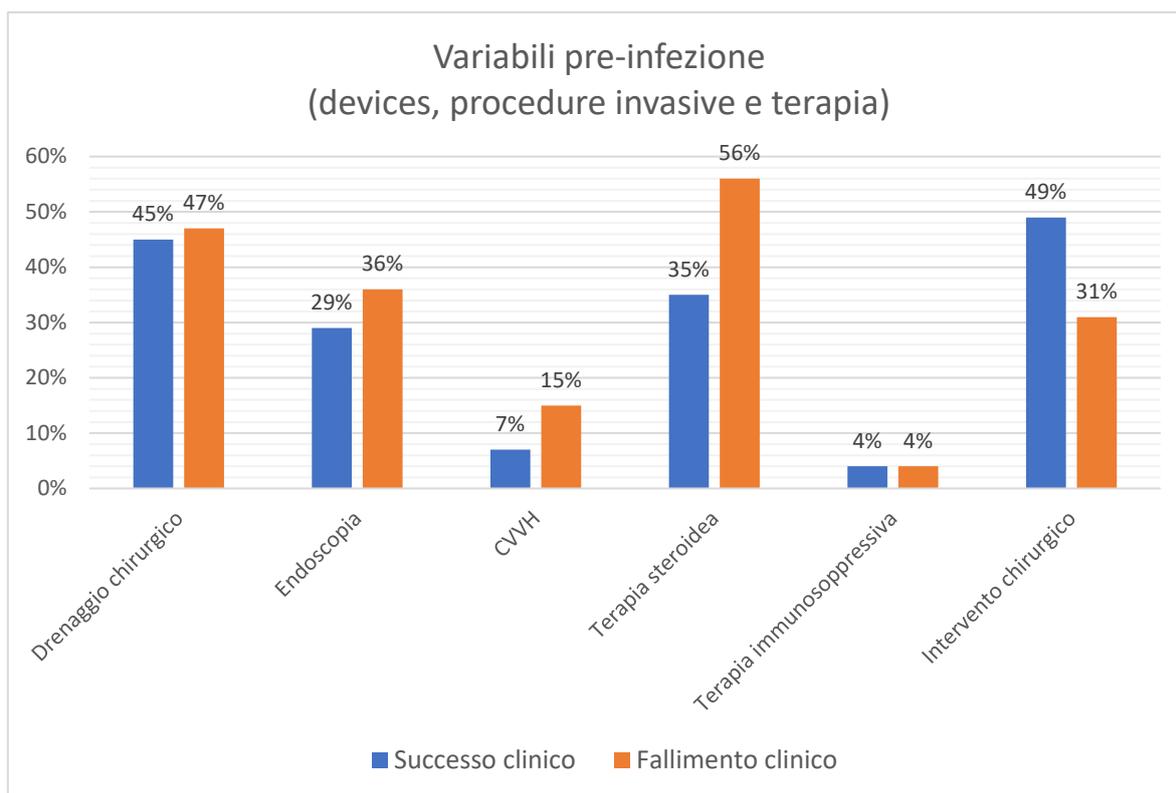
6% dei pazienti con fallimento terapeutico aveva subito un trapianto di organo solido, solo il 3% invece dei pazienti con successo terapeutico, l'infezione da HIV era presente in nessun paziente con outcome negativo e in 1 (1%) paziente con outcome positivo.

Nel 44% dei pazienti con fallimento clinico della terapia il Charlson Comorbidity index era maggiore di 3 punti, mentre nella popolazione con successo terapeutico nel 35%, ma questo dato non risulta essere statisticamente significativo.



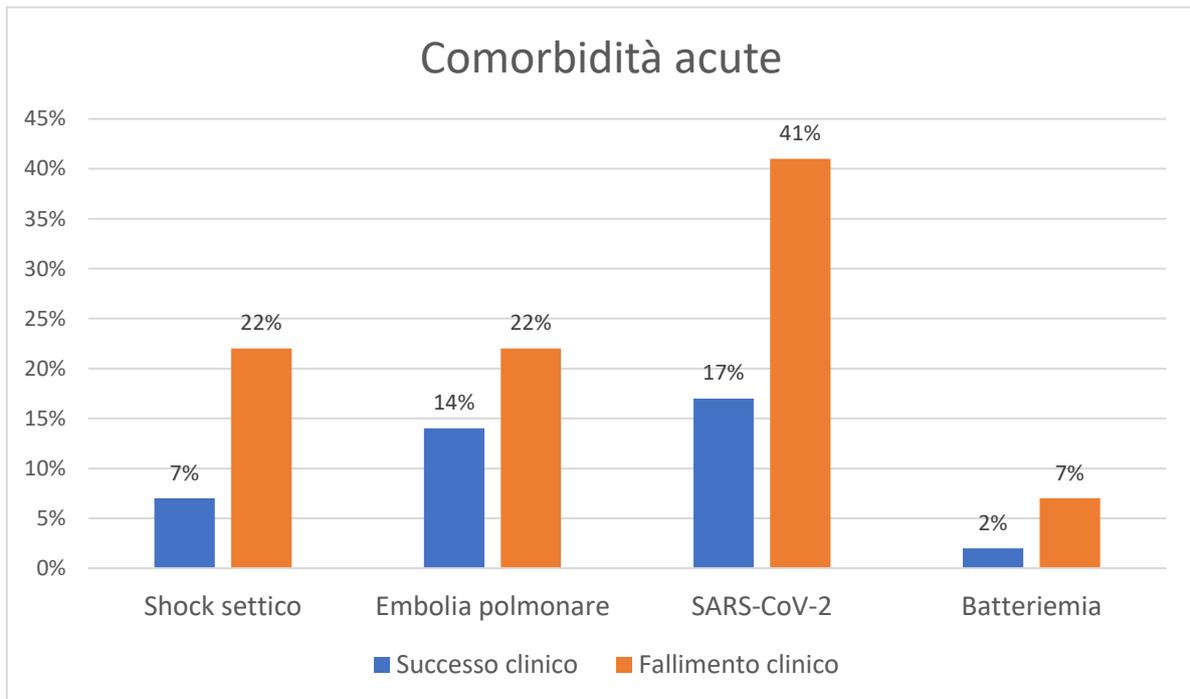
Tra le variabili pre-infezione la somministrazione della terapia steroidea è risultata essere una variabile statisticamente significativa (p 0.012), infatti dei 55 pazienti con outcome negativo era stata somministrata a 30 (56%), mentre tra i pazienti con outcome positivo è stata somministrata a 38 pazienti su 110. Anche la variabile legata all'esecuzione di un intervento chirurgico nei 3 mesi precedenti l'isolamento del batterio risulta essere statisticamente significativa (p 0.026) ed ha una prevalenza maggiore nei pazienti con successo terapeutico: il 49% dei pazienti con outcome positivo ha infatti subito un intervento chirurgico, tra i pazienti con fallimento terapeutico solo il 31%.

Le restanti variabili non sono risultate statisticamente significative e le percentuali di distribuzione per il successo e per il fallimento della terapia sono rispettivamente: 45% e 47% per il drenaggio chirurgico; 29% e 36% per le manovre endoscopiche; 7% e 15% per la dialisi; 4% in entrambe le popolazioni per la terapia immunosoppressiva. Il CVC, il catetere vescicale, il SNG e la ventilazione meccanica sono invece presidi utilizzati in tutti i pazienti inclusi nello studio.

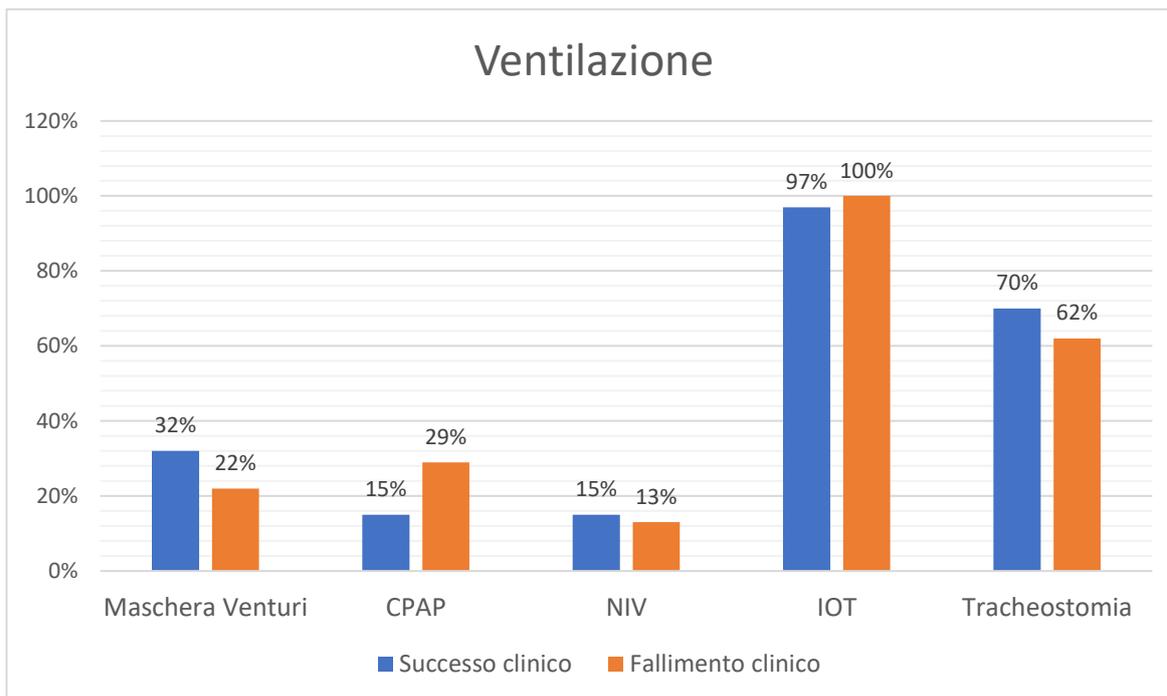


La presenza di comorbidità acute è risultata essere statisticamente significativa (p 0.006), quindi sono associate più frequentemente al fallimento terapeutico. Le comorbidità acute prese in considerazione nella valutazione del paziente sono state lo shock settico e l'embolia polmonare. Per quanto concerne la variabile legata allo shock settico, essa è risultata statisticamente significativa (p 0.007): dei 55 pazienti con outcome negativo, 12 (22%) sono andati incontro a shock settico, invece tra i pazienti con outcome positivo solo 8 su 110 (7%). Non sono risultate significative le variabili legate alla batteriemia, presente nel 7% dei pazienti con outcome negativo e nel 2% dei pazienti con outcome positivo, e alla presenza di embolia polmonare, che è stata riscontrata rispettivamente nel 22% e nel 14% dei pazienti.

La positività al SARS-CoV-2 è invece una variabile statisticamente significativa (p 0.001) ed è associata a un outcome negativo: dei pazienti con fallimento clinico della terapia il 41% aveva un'infezione da SARS-CoV-2, mentre dei pazienti con successo clinico solo il 17%.



Tra i presidi utilizzati per la ventilazione, la CPAP è stata utilizzata nel 29% dei pazienti con fallimento clinico della terapia e nel 15% dei pazienti con successo clinico. Questo dato, associato a un p di 0.026, risulta essere statisticamente significativo. Per quanto riguarda gli altri presidi usati per la ventilazione dei pazienti nessuna variabile si è dimostrata significativa: la maschera Venturi è stata utilizzata nel 32% dei pazienti con outcome positivo e nel 22% dei pazienti con outcome negativo, la NIV nel 15% e 13%, l'intubazione oro-tracheale nel 97% e 100% e la tracheostomia rispettivamente nel 70% e 62%.



L'imaging (RX/TC torace) al momento dell'isolamento di *P. aeruginosa* nella maggior parte dei casi ha mostrato la presenza di consolidazioni polmonare (82%) e in una minoranza di casi era presente impegno interstiziale (18%). In nessun caso erano presenti escavazioni o formazioni nodulari.

Le consolidazioni si osservavano nelle radiografie dell'85% di pazienti con outcome positivo e nel 75% dei pazienti con outcome negativo, mentre l'interstiziopatia era visibile rispettivamente nel 15% e 25%, ma questi dati non si sono dimostrati statisticamente significativi.

Infezioni concomitanti sono state rinvenute nel 56% dei pazienti con outcome negativo e nel 53% dei pazienti con outcome positivo, invece infezioni precedenti quella da *P. aeruginosa* rispettivamente nel 56% e 58%.

Il trattamento antibiotico somministrato ha avuto una durata mediana di 10 giorni. Nel 58% sia dei pazienti con outcome positivo che dei pazienti con outcome negativo è stata somministrata una monoterapia, nella maggior parte dei casi rappresentata da un β -lattamico (95% per l'outcome positivo e 96% per l'outcome negativo).

La terapia empirica, effettuata quindi prima della valutazione dell'antibiogramma, è stata somministrata all'81% della popolazione con successo terapeutico e al 67% della

popolazione con fallimento terapeutico e la durata mediana è stata rispettivamente di 4 e 2 giorni.

Tra i pazienti inclusi nello studio trattati con β -lattamici: al 19% dei pazienti con outcome positivo e all'11% dei pazienti con outcome negativo è stato somministrato il Ceftolozano/Tazobactam, invece rispettivamente al 29% e 31% dei pazienti il Ceftazidime/Avibactam. Questi dati non sono però risultati statisticamente significativi.

Variables	Ceftolozane/tazobactam (27)	Other therapy (138)	<i>p univariate</i>	<i>p multivariate</i>
Charlsons CI >3, n° (%)	15 (56%)	47 (34%)	0.035	
CRI	5 (19%)	4 (3%)	0.007	
Endoscopy, n° (%)	3 (11%)	46 (36%)	0.013	0.016
CVVH, n° (%)	6 (12%)	10 (7%)	0.027	
Age (years), median (IQR)	73 (49-78)	62 (50-71)	0.04	

Tabella 2 Analisi univariata dei pazienti con polmonite da *P. aeruginosa* trattati con Ceftolozano/Tazobactam o altra terapia.

Sono state poi messe in relazione diverse variabili (comorbidità, variabili pre-infezione o dati anagrafici) con il tipo di trattamento effettuato e diverse sono le variabili risultate statisticamente significative: il 56% dei pazienti trattati con Zerbaxa aveva un Charlson Comorbidity Index maggiore di 3, questo interessava solo il 34% dei pazienti che hanno subito un trattamento diverso (p 0.035); i pazienti con insufficienza renale cronica erano il 19% di quelli trattato con ceftolozano/tazobactam e il 3% di quelli trattati con altri farmaci (p 0.007); i pazienti che hanno subito CVVH erano rispettivamente il 12% e 7% (p 0.027); l'endoscopia è stata effettuata nell'11% dei pazienti trattati con Zerbaxa e nel 36% del resto della popolazione (p 0.013).

Infine, è risultata statisticamente significativa la variabile legata all'età dei pazienti: la mediana d'età dei pazienti trattati con Ceftolozano/Tazobactam era di 73 anni, contro i 62 anni della popolazione trattata con altri antimicrobici (p 0.04).

7.3 Analisi multivariata

Nell'analisi multivariata abbiamo incluso le variabili che sono risultate statisticamente significative all'analisi univariata della popolazione di pazienti presa in esame, cioè quelle con $p < 0.05$: la positività al SARS-CoV-2, lo shock settico, la presenza di una comorbidità acuta (embolia polmonare o shock settico), l'utilizzo della CPAP, la terapia steroidea e la chirurgia entro i 3 mesi precedenti.

Sono risultate variabili indipendentemente associate all'outcome negativo l'infezione da SARS-CoV-2 ($p 0.025$), lo shock settico ($p 0.033$) e la presenza delle comorbidità acute ($p 0.023$) (Tab. 3).

Inoltre, è risultata una variabile indipendente associata al trattamento con un farmaco diverso dal Cefotolozano/Tazobactam l'endoscopia effettuata entro le 72h precedenti l'infezione ($p 0.016$) (Tab. 2).

Variable	OR (95% CI)	p
COVID	5.316 (1.240-22.8)	0.025
Shock	3.955 (1.121-13.961)	0.033
Acute comorbidity	1.439 (1.051-1.971)	0.023

Tabella 3. Analisi multivariata pazienti con outcome negativo.

8. CONCLUSIONI

Una delle sfide più importanti che la medicina moderna deve fronteggiare è rappresentata dall'imponente aumento dell'antibiotico resistenza.

Questo fenomeno, che costituisce un serio problema di salute pubblica, interessa prevalentemente l'ambiente ospedaliero, a causa della pressione selettiva esercitata dai molteplici antibiotici usati in ambito nosocomiale e della capacità dei batteri di acquisire rapidamente numerose resistenze grazie a mutazioni o scambio orizzontale di materiale genetico.

Nei reparti di terapia intensiva questo fenomeno è ancor più evidente. A causa dei presidi utilizzati per la ventilazione (in particolare l'intubazione oro-tracheale), della compromissione delle funzioni vitali del paziente e dell'utilizzo di cateteri vescicali o venosi o drenaggi chirurgici, vengono meno i meccanismi di difesa che fisiologicamente garantiscono protezione dalle infezioni, favorendo quindi la colonizzazione prima e l'infezione poi da parte di Gram-positivi (soprattutto *S. aureus*) e Gram-negativi (soprattutto i patogeni del gruppo ESKAPE). Ciò è amplificato dalla necessità di affrontare lunghi ricoveri nell'ambito dello stesso reparto e dalla somministrazione quindi di diversi cicli di terapia antimicrobica nell'ambito dello stesso ricovero.

In questo scenario, risulta quindi essenziale la necessità di sviluppare nuovi antibiotici efficaci nei confronti di batteri ormai resistenti alla quasi totalità delle molecole quotidianamente utilizzate in ambito nosocomiale per garantire un successo terapeutico.

Abbiamo quindi condotto uno studio retrospettivo con l'obiettivo di valutare le infezioni a carico delle vie respiratorie causate da *P. aeruginosa* che si sono verificate nei reparti di terapia intensiva dell'Azienda Ospedaliero – Universitaria delle Marche da Gennaio 2021 a Dicembre 2022. Questo microrganismo è infatti uno dei principali responsabili di infezioni nosocomiali e in particolare di infezioni di difficile eradicazione a causa delle resistenze acquisite dal batterio stesso nei confronti di antibiotici di prima linea utilizzati per il trattamento delle infezioni da esso causate.

Lo studio ha quindi incluso pazienti definiti critici, cioè pazienti che necessitano di supporto alle funzioni vitali, e che hanno quindi insufficienza respiratoria, instabilità emodinamica, IRA, insulto neurologico o ipertensione endocranica, disordini metabolici o sepsi.

I pazienti inclusi hanno tutti effettuato un campionamento (broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, tracheoaspirato o espettorato) risultato positivo per la crescita di *P. aeruginosa*.

Nella quasi totalità dei casi le infezioni polmonari sono state classificate come VAP (ventilator-associated pneumonia); quasi tutti i pazienti, infatti, sono andati incontro ad intubazione oro-tracheale.

L'utilizzo dei diversi presidi per la ventilazione non ha mostrato associazioni significative con l'outcome ad eccezione della CPAP, il cui utilizzo è risultato associato ad un outcome peggiore (il 30% dei pazienti con fallimento clinico della terapia sono stati sottoposti a CPAP). Questo dato può essere spiegato dal fatto che la CPAP è stata utilizzata prevalentemente nei pazienti con insufficienza respiratoria causata dall'infezione da SARS-CoV-2 (il 76% dei pazienti sottoposti a CPAP era positivo all'infezione da SARS-CoV-2). L'outcome negativo potrebbe essere legato alla scelta iniziale di utilizzare una ventilazione non invasiva nei pazienti con insufficienza respiratoria e quindi ad un ritardo nell'intubazione oro-tracheale. Questo dato è però controverso e il timing dell'intubazione del paziente affetto da SARS-CoV-2 è un tema dibattuto^{60,61} e non vi sono sufficienti evidenze a supporto del dato risultato dal nostro studio.

L'outcome peggiore associato all'utilizzo di CPAP potrebbe essere legato al fatto che la concomitante polmonite da SARS-CoV-2 si è dimostrata una variabile statisticamente significativa ed associata più frequentemente a fallimento terapeutico. Anche all'analisi multivariata l'infezione da SARS-CoV-2 è risultata una variabile indipendente legata a fallimento clinico della terapia.

Numerosi studi e metanalisi^{62,63,64} evidenziano come siano frequenti le coinfezioni batteriche (anche da ceppi multiresistenti) nel corso dell'infezione da SARS-CoV-2: coinvolgono infatti circa il 7% ospedalizzati e il 14% dei pazienti ricoverati nelle terapie intensive, anche a causa l'utilizzo di ventilazione meccanica e presidi invasivi. *P. aeruginosa* risulta essere uno dei patogeni più frequentemente riscontrati in questi pazienti, insieme a *K. Pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *A. baumannii* e le resistenze riscontrate sono quelle verso i carbapenemi, la piperacillina/tazobactam oltre a ceppi MDR e XDR. Nei pazienti affetti da SARS-CoV-2, la coinfezione batterica è più frequentemente associata a una prognosi infausta.⁶⁵

Anche la somministrazione della terapia steroidea è associata frequentemente ad un outcome negativo (il 56% di coloro con fallimento clinico hanno effettuato terapia cortisonica entro

30 giorni precedenti), risultando una variabile significativa. Anche ciò può essere spiegato dall'utilizzo della terapia steroidea nella quasi totalità (93%) dei pazienti affetti da SARS-CoV-2 e generalmente negli individui con condizioni cliniche gravi e con infezione avanzata.

Ad essere statisticamente significativa è anche la presenza di comorbidità acute (embolia polmonare e shock settico), presenti nel 42% dei pazienti con outcome negativo, a dimostrazione del fatto che esse sono associate a una maggiore severità dell'infezione che compromette le funzioni vitali, quali l'equilibrio emodinamico e l'omeostasi della coagulazione.

La comorbidità acuta che ha raggiunto la significatività statistica anche all'analisi multivariata e può essere considerata un fattore prognostico negativo indipendente è lo shock settico, che si associa a una grave compromissione delle funzioni vitali del paziente a causa di un'alterata risposta dell'organismo all'infezione.

Per quanto concerne il trattamento antibiotico ricevuto dai pazienti con infezione, all'81% dei pazienti con outcome positivo è stata somministrata terapia antibiotica empirica in attesa di effettuare quella mirata sulla base dell'antibiogramma, questo è avvenuto nel 67% dei pazienti con outcome negativo. Non si tratta di un dato statisticamente significativo ($p 0.052$) ma conferma ciò che le linee guida raccomandano, cioè di intraprendere tempestivamente una terapia antibiotica empirica ad ampio spettro (in base al sospetto clinico) per garantire un'outcome migliore. Dal nostro studio non emerge una differenza significativa nell'outcome dei pazienti trattati con monoterapia o politerapia, tuttavia le linee guida indicano, nel caso di microrganismi multiresistenti, di utilizzare di una politerapia che includa un β -lattamico per garantire la completa eradicazione dell'infezione ed ottenere un successo terapeutico.

I pazienti trattati con ceftolozano/tazobactam, rispetto a quelli che hanno ricevuto un trattamento diverso, sono andati più frequentemente incontro a CVVH ed avevano un CCI più elevato. È probabile che l'associazione dello Zerbaxa a IRC, CVVH e ad un elevato Charlson Comorbidity Index, variabili risultate statisticamente significative, siano spiegabili dall'utilizzo di questo farmaco nei pazienti con condizioni cliniche più gravi, con un'età più elevata e un maggior numero di comorbidità e con infezione da un microrganismo resistente ad antibiotici generalmente utilizzati (carbapenemi, piperacillina/tazobactam). La variabile legata all'esecuzione dell'endoscopia, anch'essa statisticamente significativa, è associata più

frequentemente a pazienti trattati con farmaci diversi dallo Zerbaxa ma questo dato molto probabilmente è un risultato che dipende dal piccolo campione di pazienti arruolati che potrebbe influire sul risultato statistico.

Analizzando l'outcome della popolazione oggetto dello studio, i pazienti andati incontro a decesso entro 30 giorni dall'isolamento sono il 19% del totale e il 56% di tutti i pazienti con outcome negativo. Questo dato è probabilmente dovuto al campione preso in esame. La popolazione inclusa nello studio è infatti costituita da pazienti con compromissione delle funzioni vitali nella gran parte dei casi dovuta a trauma, infezione o incidenti cerebrovascolari, e le gravi condizioni cliniche dei pazienti ricoverati nei reparti di terapia intensiva spiegano l'elevata mortalità.

Il relapse dell'infezione è stato riscontrato nel 12% della popolazione generale e nel 35% dei pazienti con fallimento della terapia. La quota di pazienti con recidiva potrebbe dipendere dal fatto che la terapia antibiotica nella pratica clinica viene spesso rimodulata in base all'andamento clinico del paziente: il peggioramento durante l'utilizzo di un piano terapeutico spinge al cambiamento delle molecole prescelte, anche se la durata della terapia è ancora inferiore a quella consigliata nella scheda di prescrizione. Ciò può portare a un ritardo nella somministrazione di antibiotici che risultano efficaci per la risoluzione dell'infezione. Inoltre spesso i microrganismi responsabili dell'infezione, soprattutto in pazienti in gravi condizioni cliniche e immunocompromessi, possono acquisire resistenza ai farmaci utilizzati nel corso dell'infezione grazie alla selezione di ceppi in grado di sopravvivere in un ambiente con concentrazioni di antibiotico elevate. Questo porta in alcuni casi ad una iniziale risoluzione dell'infezione seguita però da un successivo peggioramento clinico e da un nuovo riscontro, dopo coltura dei campioni prelevati, del medesimo batterio. Nonostante quanto evidenziato, è necessario sottolineare che questo studio presenta dei limiti. Il primo è l'essere uno studio retrospettivo, quindi più limitato: la ricerca dei dati relativi ai pazienti non più presenti nel nosocomio si accompagna alla necessaria rielaborazione. È inoltre uno studio monocentrico, per cui i risultati non possono essere estesi ad altre strutture ed è stato condotto su un numero limitato (165) di pazienti.

9. BIBLIOGRAFIA

1. The top 10 causes of death (n.d.) World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Antibiotico-resistenza. (n.d.). Istituto Superiore Di Sanità. <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss>
3. Wilson, M. G., & Pandey, S. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
4. Stratton, C. (1983). *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 4(1), 36-40. doi:10.1017/S0195941700057647
5. Adams, B. G., & Marrie, T. J. (1982). Hand carriage of aerobic Gram-negative rods by health care personnel. *The Journal of hygiene*, 89(1), 23–31. <https://doi.org/10.1017/s0022172400070509>
6. Adams, B. G., & Marrie, T. J. (1982). Hand carriage of aerobic gram-negative rods may not be transient. *The Journal of hygiene*, 89(1), 33–46. <https://doi.org/10.1017/s0022172400070510>
7. Mayank, D., Anshuman, M., Singh, R. K., Afzal, A., Baronia, A. K., & Prasad, K. N. (2009). Nosocomial cross-transmission of *Pseudomonas aeruginosa* between patients in a tertiary intensive care unit. *Indian journal of pathology & microbiology*, 52(4), 509–513. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.56143>
8. Tschudin-Sutter, S., Pargger, H., & Widmer, A. F. (2010). Hand hygiene in the intensive care unit. *Critical care medicine*, 38(8 Suppl), S299–S305. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181e6a23f>
9. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K. Olson, M. V. (2000). Complete genome

- sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
10. De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
 11. Wang, S., Xiang, D., Tian, F., & Ni, M. (2021). Lipopolysaccharide from biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induces macrophage hyperinflammatory responses. *Journal of medical microbiology*, 70(4), 001352. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001352>
 12. Florez, C.; Raab, J.E.; Cooke, A.C.; Schertzer, J.W. Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 2017, 8 <https://doi.org/10.1128/mbio.01034-17>
 13. Huszczyński, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
 14. Pieterse, E., Rother, N., Yanginlar, C., Hilbrands, L. B., & van der Vlag, J. (2016). Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in immunology*, 7, 484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00484>
 15. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

16. Moussouni, M., Berry, L., Sipka, T., Nguyen-Chi, M., & Blanc-Potard, A. B. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* OprF plays a role in resistance to macrophage clearance during acute infection. *Scientific reports*, 11(1), 359. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79678-0>
17. Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS microbiology reviews*, 41(5), 698–722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
18. Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(6), 1053–1064. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
19. Wei, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
20. Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D. J., & Ma, L. Z. (2015). The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology reports*, 7(2), 330–340. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
21. Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C., & Parsek, M. R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 7(1), e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
22. Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 175(11), 7512–7518. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>

23. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens*, 4(11), e1000213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
24. Juhas, M., Eberl, L., & Tümmler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental microbiology*, 7(4), 459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00769.x>
25. Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242–1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>
26. Tan, R. M., Kuang, Z., Hao, Y., & Lau, G. W. (2014). Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. *Journal of innate immunity*, 6(2), 227–239. <https://doi.org/10.1159/000354304>
27. Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300(8), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
28. Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M., & Gejyo, F. (1999). The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS immunology and medical microbiology*, 25(3), 313–321. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01356.x>
29. *FEMS immunology and medical microbiology*. (Vol. 25). (1999). Elsevier Science Publishers. pp. 313-321
30. Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 246, 126719. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>

31. Chen, L., Zou, Y., She, P., & Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 172, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.004>
32. Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
33. O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance. 2014.
34. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
35. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. (n.d.) World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
36. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the European Union and the European Economic Area, 2016-2020. Stockholm: ECDC; 2022
37. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
38. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

39. Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* (London, England), 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
40. Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., & Ramphal, R. (2007). Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Molecular microbiology*, 63(4), 1026–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05573.x>
41. Jones R. N. (2010). Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51 Suppl 1, S81–S87. <https://doi.org/10.1086/653053>
42. Kohbodi, G. A., Rajasurya, V., & Noor, A. (2022). Ventilator-Associated Pneumonia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
43. Jain V, Vashisht R, Yilmaz G, Bhardwaj A. (2023) Pneumonia Pathology. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
44. Safdar, N., Crnich, C. J., & Maki, D. G. (2005). The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respiratory care*, 50(6), 725–741.
45. Alonso, B., Fernández-Barat, L., Di Domenico, E. G., Marín, M., Cercenado, E., Merino, I., de Pablos, M., Muñoz, P., & Guembe, M. (2020). Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC infectious diseases*, 20(1), 909. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1>
46. Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(11), 1209–1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>

47. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7, 212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
48. Kuti, E. L., Patel, A. A., & Coleman, C. I. (2008). Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. *Journal of critical care*, 23(1), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2007.08.007>
49. Yusuf, E., Bax, H. I., Verkaik, N. J., & van Westreenen, M. (2021). An Update on Eight "New" Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Journal of clinical medicine*, 10(5), 1068. <https://doi.org/10.3390/jcm10051068>
50. Takeda, S., Ishii, Y., Hatano, K., Tateda, K., & Yamaguchi, K. (2007). Stability of FR264205 against AmpC beta-lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*, 30(5), 443–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.019>
51. Zhanel, G. G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuik, A., Schweizer, F., Lagacé-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Gin, A. S., Walkty, A., Hoban, D. J., Lynch, J. P., 3rd, & Karlowsky, J. A. (2014). Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*, 74(1), 31–51. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0168-2>
52. Miller, B., Hershberger, E., Benziger, D., Trinh, M., & Friedland, I. (2012). Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3086–3091. <https://doi.org/10.1128/AAC.06349-11>
53. Zerbaxa. (n.d.) European Medicines Agency (europa.eu). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zerbaxa#authorisation-details-section>

54. Chandorkar, G., Huntington, J. A., Gotfried, M. H., Rodvold, K. A., & Umeh, O. (2012). Intrapulmonary penetration of ceftolozane/tazobactam and piperacillin/tazobactam in healthy adult subjects. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(10), 2463–2469. <https://doi.org/10.1093/jac/dks246>
55. van Duin, D., & Bonomo, R. A. (2016). Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(2), 234–241. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw243>
56. Lob, S., Hoban, D. J., Young, K., Motyl, M., & Sahm, D. F. (2020). Activity of ceftolozane–tazobactam and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* from patients in different risk strata – SMART United States 2016–2017. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.017>
57. Giaccari, L. G., Pace, M. C., Passavanti, M. B., Gargano, F., Aurilio, C., & Sansone, P. (2021). Ceftolozane/Tazobactam for Resistant Drugs *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Infections: A Systematic Literature Review of the Real-World Evidence. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(6), 474. <https://doi.org/10.3390/life11060474>
58. Montero, M., Domene Ochoa, S., López-Causapé, C., VanScoy, B., Luque, S., Sorlí, L., Campillo, N., Angulo-Brunet, A., Padilla, E., Prim, N., Pomar, V., Rivera, A., Grau, S., Ambrose, P. G., Oliver, A., & Horcajada, J. P. (2020). Efficacy of Ceftolozane-Tazobactam in Combination with Colistin against Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Including High-Risk Clones, in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(4), e02542-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02542-19>
59. Montero, M., VanScoy, B. D., López-Causapé, C., Conde, H., Adams, J., Segura, C., Zamorano, L., Oliver, A., Horcajada, J. P., & Ambrose, P. G. (2018). Evaluation of Ceftolozane-Tazobactam in Combination with Meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 175 in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(5), e00026-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00026-18>

60. Papoutsis, E., Giannakoulis, V. G., Xourgia, E., Routsis, C., Kotanidou, A., & Siempos, I. I. (2021). Effect of timing of intubation on clinical outcomes of critically ill patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of non-randomized cohort studies. *Critical care (London, England)*, 25(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03540-6>
61. Tobin, M. J., Laghi, F., & Jubran, A. (2020). Caution about early intubation and mechanical ventilation in COVID-19. *Annals of intensive care*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00692-6>
62. Lansbury, L., Lim, B., Baskaran, V., & Lim, W. S. (2020). Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of infection*, 81(2), 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
63. Kariyawasam, R. M., Julien, D. A., Jelinski, D. C., Larose, S. L., Rennert-May, E., Conly, J. M., Dingle, T. C., Chen, J. Z., Tyrrell, G. J., Ronksley, P. E., & Barkema, H. W. (2022). Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019–June 2021). *Antimicrobial resistance and infection control*, 11(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01085-z>
64. Rawson, T. M., Wilson, R. C., & Holmes, A. (2021). Understanding the role of bacterial and fungal infection in COVID-19. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.025>
65. Garcia-Vidal, C., Sanjuan, G., Moreno-García, E., Puerta-Alcalde, P., Garcia-Pouton, N., Chumbita, M., Fernandez-Pittol, M., Pitart, C., Inciarte, A., Bodro, M., Morata, L., Ambrosioni, J., Grafia, I., Meira, F., Macaya, I., Cardozo, C., Casals, C., Tellez, A., Castro, P., Marco, F. COVID-19 Researchers Group (2021). Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.041>