



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Utilità dei vaccini per far fronte al dilagare
della resistenza ai farmaci antimicrobici

Vaccines Against Antimicrobial Resistance

Rosini et al., *Frontiers in Immunology* 2020,
doi: 10.3389/fimmu.2020.01048

Tesi di Laurea di:

Giulio Gatto

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

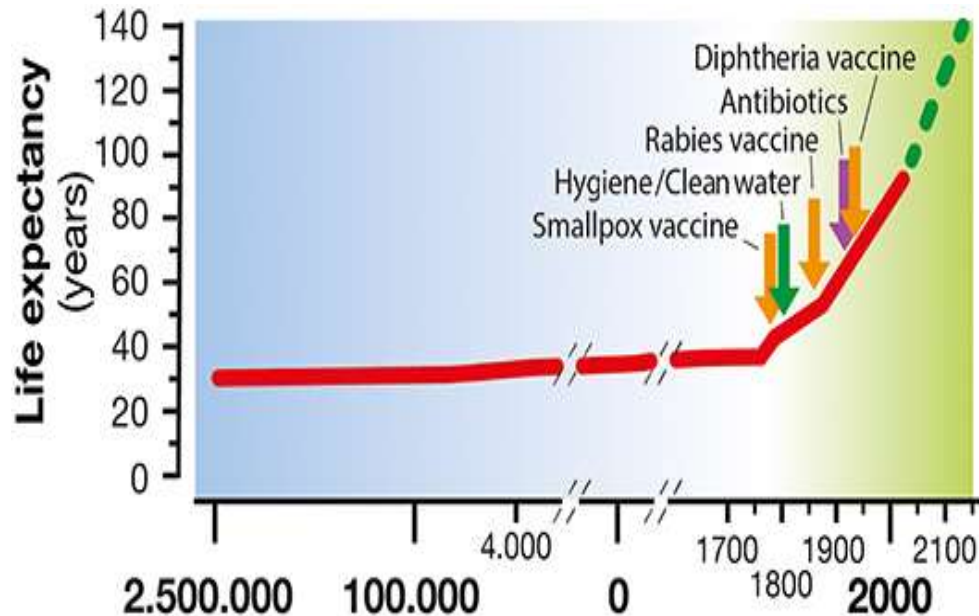
Francesca Biavasco

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2019/2020

Un Pilastro Vacillante

Negli ultimi tre secoli l'aspettativa di vita media di un essere umano è raddoppiata grazie a tre fondamentali pilastri dell'era moderna: il miglioramento delle condizioni igieniche, i vaccini e gli antibiotici.

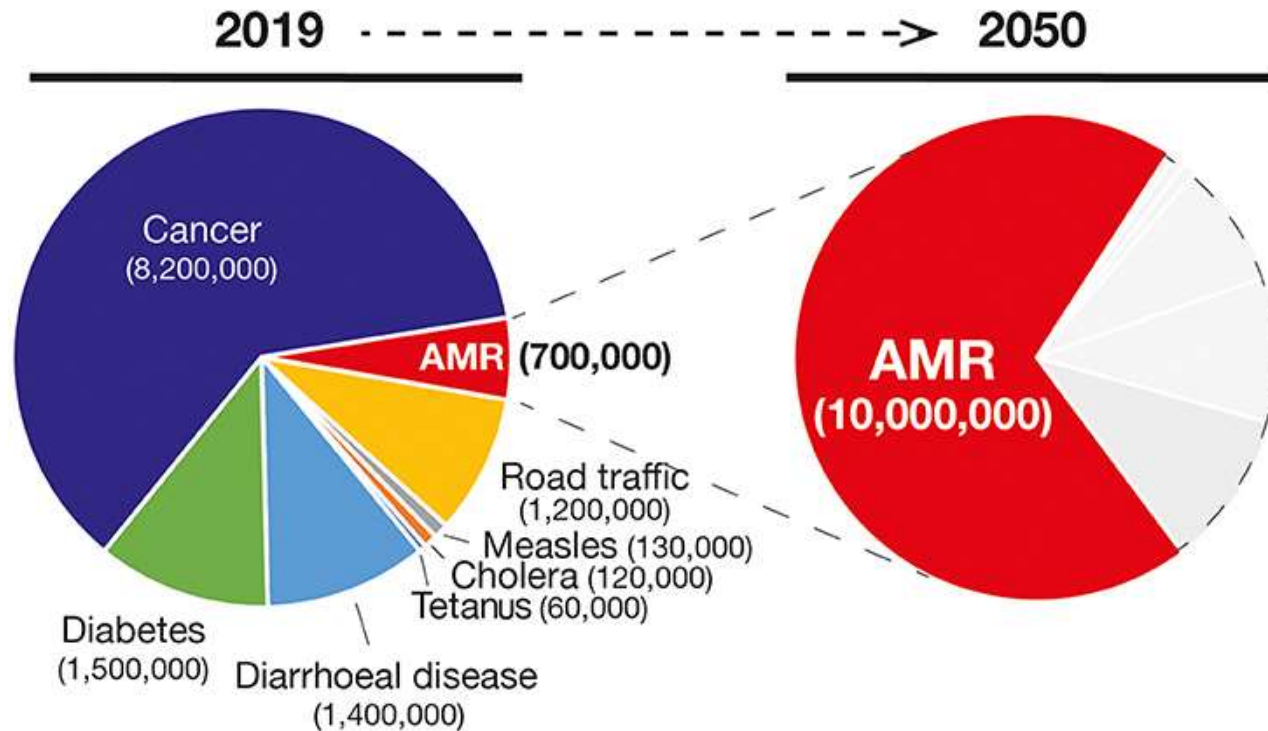


Rosini et al., 2020

La **Vaccinazione** allena il sistema immunitario umano a riconoscere e rispondere prontamente a un agente patogeno.

Gli **Antibiotici** sono farmaci in grado di agire direttamente su uno o più agenti patogeni, determinandone la morte o controllandone la proliferazione.

L'efficacia degli antibiotici è diminuita negli ultimi decenni a causa di meccanismi di **RESISTENZA** sviluppatasi in molti agenti patogeni, portando all'aumento dei decessi per infezioni fino a pochi anni fa prive di complicazioni



Rosini et al., 2020

I patogeni antibiotico resistenti nel 2019 hanno causato nel mondo 700.000 decessi, e ne causeranno 10 milioni nel 2050 se non ridurremo l'uso degli antibiotici nel trattamento delle infezioni.

Meccanismi di Resistenza

La resistenza ad un dato antibiotico in un microrganismo può verificarsi con tre modalità principali:

➤ **INATTIVAZIONE DELL'ANTIBIOTICO** attraverso appositi enzimi che lo modificano chimicamente. Gli antibiotici così modificati non riescono più a legarsi alla molecola bersaglio, con conseguente perdita della loro efficacia.

➤ L'enzima NDM-1, in grado di neutralizzare penicilline, cefalosporine e carbapenemi, è stato rinvenuto in alcune Enterobatteriacee e in *P. aeruginosa*.

➤ **DIMINUZIONE DELLA PERMEABILITA'** di membrana, riducendo l'ingresso di antibiotici nella cellula. La minore espressione delle porine e/o la sovraespressione delle pompe di efflusso (dovute a mutazioni) conferiscono al microrganismo che le possiede resistenza ad un ampio spettro di antibiotici.

➤ E' stato isolato un mutante di *E. coli* multiresistente, grazie alla presenza di copie multiple del gene per la pompa di efflusso AcrAB sul suo cromosoma.

➤ **MODIFICA DELLA MOLECOLA BERSAGLIO** attraverso appositi enzimi o per mutazioni geniche. Le modifiche apportate sono tali da impedire il legame dell'antibiotico, senza intaccare la funzionalità della molecola. Non riuscendo a legarsi alla sua molecola target, l'antibiotico non ha effetti sul microrganismo pur rimanendo nella sua forma attiva.

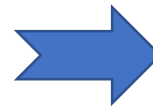
➤ Lo *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) produce una forma mutata della transpeptidasi PBP2 che è in grado di sintetizzare la parete batterica senza essere riconosciuta dagli antibiotici β -lattamici.

L'uso ripetuto e smodato di antibiotici genera una **PRESSIONE SELETTIVA** sulle popolazioni di microrganismi, selezionando ceppi sempre più resistenti alle terapie che richiederanno dosi più alte di antibiotico o lo sviluppo di nuove molecole battericide per essere trattati.

I meccanismi di resistenza si sviluppano a causa di mutazioni casuali, che una volta entrate stabilmente nel genoma batterico possono essere trasmesse ad altri microrganismi grazie al **Trasferimento Genico Orizzontale (HGT)**.



Attraverso meccanismi di Coniugazione, Trasformazione e Trasduzione, l'informazione genetica può essere trasferita anche a batteri di specie non affini, aumentando enormemente la diffusione delle antibiotico resistenze.



Negli anni si sono sviluppate nei batteri intere **ISOLE GENOMICHE** e **PLASMIDI** facilmente trasmissibili, contenenti geni per la resistenza a più tipi di antibiotici, la cui diffusione accelera sempre più il diffondersi delle resistenze.


Evoluzione della Resistenza: cosa si è sbagliato?

L'**ABUSO** di antibiotici nelle strutture ospedaliere e negli allevamenti animali genera una pressione selettiva costante sulle popolazioni batteriche.

L'incapacità di identificare velocemente lo specifico patogeno infettante porta spesso all'uso di antibiotici **AD AMPIO SPETTRO**, creando una pressione selettiva su batteri diversi dal microrganismo bersaglio (SELEZIONE DEGLI SPETTATORI).

L'assunzione continua di antibiotici provoca anche **DANNI AL MICROBIOTA** umano con relativa perdita dei suoi effetti protettivi, aumentando negli individui la **SENSIBILITA' ALLE INFEZIONI**.

A questi tre fattori vanno aggiunti gli effetti della **GLOBALIZZAZIONE**, che permette la rapida diffusione delle resistenze in tutto il Mondo.

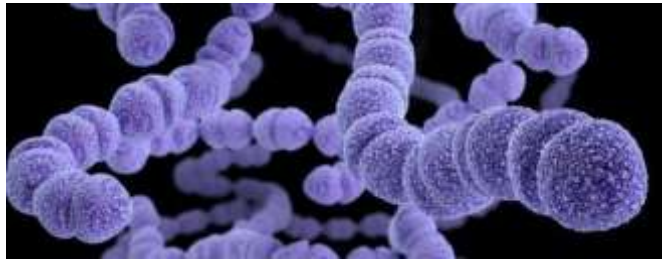


Sviluppo e diffusione di **BATTERI PAN-RESISTENTI** con alto tasso di morbilità e mortalità, che hanno un forte impatto economico specialmente sui sistemi sanitari.

RIDUCONO L'USO INAPPROPRIATO DEGLI ANTIBIOTICI

vista la minore incidenza della malattia.

Il vaccino anti influenzale porta alla diminuzione dei casi di infezione nella popolazione anziana, riducendo la prescrizione (a volte inutile) di antibiotici per il loro trattamento terapeutico.



Centers for Disease Control and Prevention

RIDUCONO LO SVILUPPO DI CEPPI RESISTENTI,

avendo efficacia indipendentemente dalle resistenze sviluppate dai patogeni.

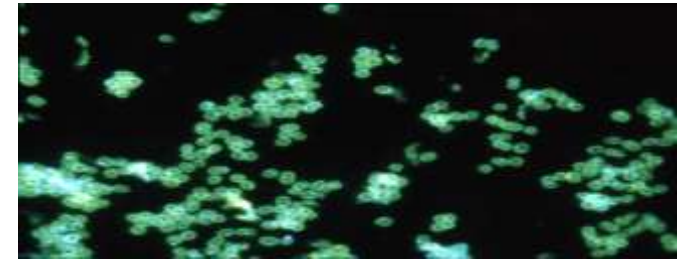
La vaccinazione contro lo Pneumococco negli Stati Uniti ha ridotto del 57% l'incidenza di malattie pneumococciche invasive insensibili alle penicilline.

PROTEZIONE CROCIATA

I vaccini contro una specie batterica riducono il tasso di infezione anche delle specie affini.

In seguito alla vaccinazione contro il Meningococco B in Nuova Zelanda si sono registrati il 31% di casi di gonorrea in meno.

N. meningitidis e *N. gonorrhoeae* hanno 57 antigeni in comune, condividendo l'80-90% del genoma.



Centers for Disease Control and Prevention

Perché i Vaccini?

VACCINI CONTRO BATTERI ANTIBIOTICO RESISTENTI

Vaccini contro batteri multiresistenti sono ancora in fase di sperimentazione, a causa dei numerosi fattori di virulenza da neutralizzare e della mancanza di modelli animali rappresentativi delle malattie umane.

Uno scopo, mille soluzioni

Per la produzione di un vaccino è necessario attenuare o inattivare la virulenza dell'agente patogeno da inoculare, **CONSERVANDONE L'IMMUNOGENICITA'**. Esistono due categorie principali di vaccini:

- ▶ I **VACCINI VIVI ATTENUATI (LAV)** contengono un agente patogeno indebolito o parzialmente neutralizzato in laboratorio; simulando nell'organismo una infezione naturale danno luogo a sintomi nulli o lievi. I LAV consentono una stimolazione antigenica prolungata con produzione di cellule memoria, indotta per esempio dal LAV contro la tubercolosi contenente *M. bovis* attenuato. Per molti agenti patogeni virali il rischio di reinfezione è nullo, a causa dell'induzione di anticorpi contro antigeni non soggetti a variabilità. Una volta vaccinati contro il morbillo o la varicella ad esempio, se ne diventa immuni per tutta la vita. Se l'agente patogeno viene ucciso prima di essere inoculato, il vaccino risultante viene detto **INATTIVATO**.
- ▶ I **VACCINI A SUBUNITA'** contengono solo le parti dell'agente patogeno che sono in grado di scatenare una risposta immunitaria (**Antigeni**). Grazie alle nuove tecnologie di *editing* genetico questa categoria di vaccini è sempre più utilizzata

Con la tecnologia del **DNA RICOMBINANTE** è possibile produrre vaccini attenuati sicuri, creando un ceppo mutante privo di virulenza (attenuato) di un agente patogeno. E' stato possibile anche produrre tossine private appositamente della loro tossicità, ma non del loro potere antigenico.

- Creazione in laboratorio un rotavirus bovino che espone sulla sua superficie le proteine di membrana di 5 tipi diversi di rotavirus umani.
- Produzione di tossina pertussica detossificata.

Tecnologie moderne...

GLICOCONIUGATI

Se gli antigeni sono dei polisaccaridi essi possono essere legati a delle **PROTEINE CARRIER** in grado di attivare anche la risposta dei linfociti T helper, ottimizzando l'immunogenicità del vaccino. La produzione di glicoconiugati è diventata più rapida ed economica grazie alla **BIOCONIUGAZIONE**, tecnica che sfrutta ceppi mutati di *E. coli* che esprimono il polisaccaride antigenico, la proteina carrier e l'enzima in grado di legarli covalentemente, in un unico passaggio.

- Il tossoide tetattico è stato usato come proteina carrier. I vaccini contro il meningococco di tipo A e *H. influenzae* di tipo B sono glicoconiugati.

ADIUVANTI

Sono sostanze aggiunte al vaccino per migliorare la velocità, la potenza e la resistenza della risposta immunitaria, rendendola simile a quella data dall'agente patogeno vivo e integro. L'alluminio è stato il primo adiuvante ad essere utilizzato nei vaccini umani. I vaccini moderni contengono invece dei **SISTEMI ADIUVANTI**, formati da due o più molecole immunostimolanti.

- Il sistema adiuvante AS01 contiene due immunostimolanti diversi e viene usato nei vaccini contro la Malaria e l'*Herpes Zoster*.

REVERSE VACCINOLOGY

Utilizza la bioinformatica per cercare nei genomi batterici i geni codificanti gli antigeni, specie quelli di superficie o secreti. Questi geni vengono utilizzati per produrre in *E. coli* gli antigeni desiderati, la cui immunogenicità verrà valutata **PRECLINICAMENTE** tramite simulazioni in silico e modelli animali. Il genoma batterico può anche essere modificato per ricavare antigeni più efficienti di quelli naturali.

- I vaccini GMMA contengono vescicole di membrana esterna di un ceppo batterico mutante che le sovraesprime. I vaccini a Nanoparticelle contengono proteine autoassemblanti legate a epitopi immunogenici.

...e del Futuro

VACCINI STRUTTURALI

Vengono selezionati (e a volte ingegnerizzati) gli Anticorpi per uno specifico antigene. Attraverso lo studio della struttura tridimensionale del complesso Antigene - Anticorpo è possibile progettare e sintetizzare degli **EPITOPHI OTTIMIZZATI**, che inducono meglio la risposta immunitaria. E' inoltre possibile mettere a punto delle molecole chimeriche che sono in grado di provocare **REATTIVITA' CROCIATA**, esponendo gli epitopi delle diverse varianti di un ceppo batterico.

➤ Ingegnerizzando la proteina fHbp è stato possibile sviluppare un vaccino che sviluppa nell'organismo reattività crociata a tre varianti di *N. meningitidis*.

ANTICORPI MONOCLONALI

Sono anticorpi tutti uguali, prodotti dalla stessa linea cellulare di linfociti B. Se inoculati **DURANTE L'INFEZIONE** innescano nel paziente una marcata risposta immunitaria specifica. La loro efficacia dipende dalla conservazione e dal livello di espressione del loro epitopo corrispondente. Grazie allo studio di anticorpi monoclonali naturali, prelevati da donatori immunizzati, sarà possibile produrre Antigeni ottimizzati.

➤ E' stato approvato per uso clinico un trattamento a base di anticorpi monoclonali contro la tossina B di *C. difficile*, per la prevenzione delle infezioni ricorrenti nei pazienti ad alto rischio.

VACCINI A RNA

RNA messaggeri codificanti per antigeni vengono sintetizzati e inoculati nell'ospite. La loro traduzione in proteine da parte dei ribosomi cellulari porta alla **PRODUZIONE DI ANTIGENI NELL'OSPITE**. A differenza dei vettori virali e dei vaccini a DNA, i vaccini a RNA non interagiscono col genoma dell'ospite, hanno un basso costo di produzione e permettono anche la produzione di grandi quantità di antigeni in breve tempo.

➤ Un vaccino a RNA codificante per la Streptolisina O mutata e per la proteina strutturale BP-2° di *S. pyogenes* e *S. agalactiae* ha avuto effetto immunogeno nei topi in cui è stato inoculato.

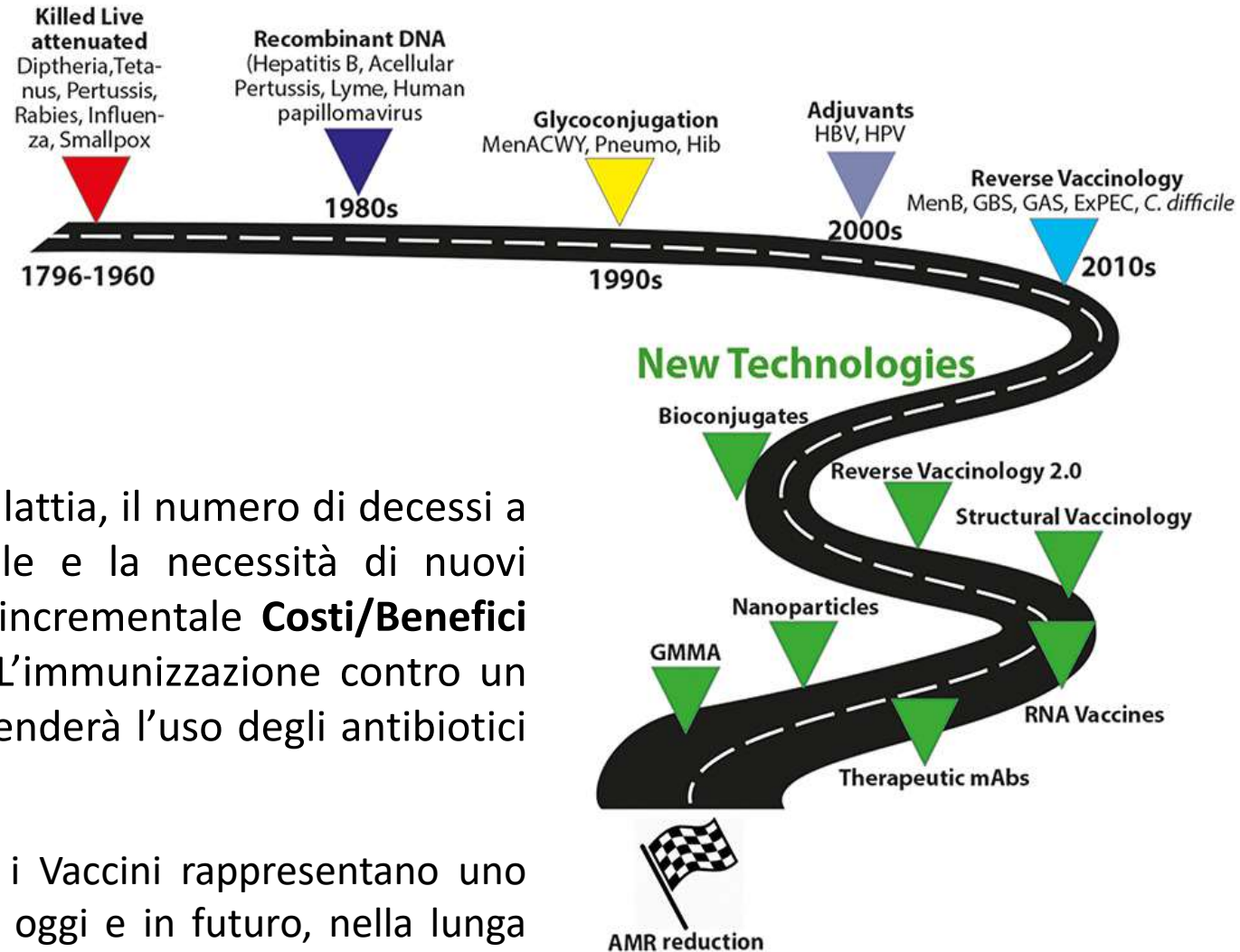
Conclusioni e Prospettive Future

L'aumento della resistenza antimicrobica è una minaccia per la Medicina moderna e rappresenta anche un **grave onere economico** per i sistemi sanitari.

➤ Secondo una stima della Banca Mondiale, entro il 2050 l'economia globale potrebbe perdere fino al 3,8% del proprio prodotto interno lordo a causa delle antibiotico resistenze.

La **Vaccinazione** diminuisce l'incidenza della malattia, il numero di decessi a essa collegati, le lunghe degenze in ospedale e la necessità di nuovi antibiotici. In economia sanitaria, il rapporto incrementale **Costi/Benefici** dei Vaccini sta diminuendo di anno in anno. L'immunizzazione contro un numero sempre maggiore di agenti patogeni renderà l'uso degli antibiotici necessario solo in rari e gravi casi.

Per la loro grande efficacia e versatilità quindi, i Vaccini rappresentano uno **strumento prezioso** e straordinario da utilizzare, oggi e in futuro, nella lunga lotta contro le antibiotico resistenze.



Riassunto

I tre fattori che hanno portato l'aspettativa di vita media dell'uomo moderno a raddoppiarsi sono il miglioramento delle condizioni igieniche, i vaccini e gli antibiotici. Da alcuni decenni sempre più agenti patogeni stanno però diventando **resistenti** ai farmaci antibiotici. L'inefficacia delle terapie antibiotiche, oltre a rappresentare un onere sempre maggiore per i sistemi sanitari nazionali, porterà in pochi decenni al drastico aumento dei decessi per infezioni prima ritenute curabili. Per resistere all'azione degli antibiotici la cellula batterica può: produrre enzimi che modificano l'antibiotico rendendolo non funzionale, modificare le molecole target dell'antibiotico o rendere la sua membrana meno permeabile alle molecole di antibiotico. La pressione selettiva esercitata dagli antibiotici sulle popolazioni batteriche e i meccanismi di trasferimento genico orizzontale (HGT) sono causa rispettivamente dello sviluppo e della diffusione delle antibiotico resistenze. L'abuso di antibiotici come terapia, l'uso di antibiotici ad ampio spettro, la aumentata sensibilità alle infezioni provocata da danni al microbiota conseguenti all'uso di antibiotici e la globalizzazione stanno portando allo sviluppo e alla diffusione di **ceppi batterici pan-resistenti**.

La **Vaccinazione** consente di ridurre l'abuso di antibiotici e l'insorgenza di ceppi resistenti, oltre sviluppare negli individui immunità crociata e a poter essere impiegata contro i batteri multiresistenti. I vaccini contengono tutto o parte dell'agente patogeno, privato della virulenza ma ancora in grado di scatenare una **risposta immunitaria**. Le tecnologie del DNA ricombinante stanno rivoluzionando le tecniche di produzione dei vaccini, rendendoli sempre più **efficaci** ed **economici**. L'immunogenicità di un vaccino può essere controllata e migliorata attraverso l'uso di glicconiugati e adiuvanti, e se ne possono testare gli effetti preclinicamente grazie alla vaccinologia inversa. Le terapie a base di anticorpi monoclonali sono già un valido aiuto contro le infezioni ripetute e ci aiuteranno sempre più nella lotta ai batteri multiresistenti. Tecniche innovative come la vaccinologia strutturale e i vaccini a RNA sono in fase di sperimentazione e porteranno allo sviluppo di vaccini sempre più sicuri e variegati.

In ultima analisi l'articolo di Rosini et al. pone l'accento sull'utilità, la necessità e il costo contenuto dei vaccini nella lotta contro le antibiotico resistenze, che potrebbe portare gravi perdite umane ed economiche nei prossimi decenni.