



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CC 2014IT16M2OP005), risorse FSE REACT-EU Azione IV.4 "Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell'innovazione" e Azione IV.5 "Dottorati su tematiche Green"

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE "V. TIBERIO"



Dottorato di ricerca in Medicina Traslazionale e Clinica

XXXVII CICLO

Settore scientifico disciplinare Malattie dell'Apparato Visivo MEDS-17/A

TESI DI DOTTORATO

**Antibiotico resistenza congiuntivale secondaria ad incongruo utilizzo
sistemico di antibiotici**

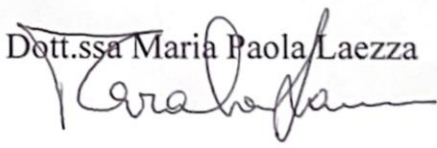
Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giovanni Scapagnini

Tutor

Ch.mo Prof.  Ciro Costagliola

Candidata

Dott.ssa  Maria Paola Laezza

A.A. 2023/2024

Sommario

Abstract	3
Introduzione	6
Capitolo 1	10
1.1 Antibiotico resistenza e suoi meccanismi d'azione	10
1.2 Antibiotico resistenza e ambiente	14
1.3 L'approccio 'One Health'	17
Capitolo 2	18
2.1 Il microbioma oculare	18
2.2 Antibiotico resistenza oculare	20
2.3 L'olio ozonizzato liposomiale e sue applicazioni in oftalmologia	21
Capitolo 3	24
3.1 Materiali e Metodi	24
3.2 Risultati	27
Capitolo 4	35
Discussione	35
4.1 Flora batterica oculare e implicazioni cliniche nella profilassi perioperatoria	36
4.2 Antibiotico-resistenza: una minaccia crescente anche in oftalmologia	38
4.3 Meccanismi molecolari di resistenza nella flora oculare residente	39
4.4 Antisettici come alternativa sostenibile: evidenze e prospettive	40
4.5 Sicurezza e tollerabilità del trattamento	41
4.6 Implicazioni cliniche e sanitarie	41
Conclusioni	42
Bibliografia:	44

Abstract

Obiettivo

Valutare l'efficacia di un collirio a base di olio ozonizzato nel ridurre la carica batterica congiuntivale in pazienti sottoposti a chirurgia della cataratta, e analizzare il profilo di resistenza agli antibiotici dei patogeni oculari, con particolare attenzione all'impatto dell'uso sistemico pregresso di antibiotici.

Setting

Studio condotto presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli in collaborazione con il Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute "Vincenzo Tiberio" dell'Università del Molise.

Disegno dello studio

Studio prospettico, interventistico, non randomizzato.

Metodi

Sono stati arruolati 100 pazienti sottoposti ad intervento di cataratta tra gennaio e settembre 2024. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi:

- Gruppo 1 (n=50): storia di infezioni urinarie ricorrenti trattate con antibiotici sistemici.
- Gruppo 2 (n=50): senza storia di terapie antibiotiche sistemiche.

Entrambi i gruppi hanno ricevuto collirio con olio ozonizzato allo 0,5% in liposomi per tre giorni pre-operatori. Tamponi congiuntivali sono stati prelevati al tempo basale (T0) e subito prima dell'intervento (T3) per l'analisi microbiologica.

Risultati

È stata osservata una significativa riduzione della carica batterica in entrambi i gruppi. I patogeni isolati erano prevalentemente Gram-positivi, in particolare

Staphylococcus epidermidis. È stata rilevata una crescente resistenza a classi di antibiotici come fluorochinoloni e aminoglicosidi, soprattutto nel Gruppo 1 ($p < 0,0001$). Il trattamento con olio ozonizzato ha mostrato un'efficacia paragonabile tra i gruppi nella riduzione della carica batterica e nella prevenzione delle infezioni post-operatorie, con buona tollerabilità.

Conclusioni

L'uso pregresso di antibiotici sistemici può favorire la selezione di ceppi resistenti anche a livello oculare. Il trattamento con olio ozonizzato rappresenta un'alternativa promettente e ben tollerata agli antibiotici convenzionali, suggerendo il potenziale ruolo degli antisettici non antibiotici nella prevenzione delle infezioni oculari e nella lotta contro l'antibiotico-resistenza.

Introduzione

L'antibiotico resistenza rappresenta una delle sfide più gravi per la salute pubblica globale, con impatti significativi sulla mortalità, sui costi sanitari e sull'efficacia delle terapie. Il crescente fenomeno della resistenza è frequentemente attribuito all'incongruo utilizzo di antibiotici sistemici, all'auto-prescrizione e alla somministrazione in assenza di indicazioni cliniche appropriate. Queste pratiche non solo contribuiscono all'emergere di ceppi batterici resistenti, ma compromettono anche i progressi della medicina moderna, rendendo infezioni precedentemente trattabili nuovamente letali.

Il consumo eccessivo e scorretto di antibiotici nel tempo è sempre stato accompagnato all'insorgenza di resistenza nei batteri (evoluzione batterica adattiva guidata dagli antibiotici), creando quindi la necessità di produrre nuove molecole in grado di sopperire a questa problematica, considerata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) una delle tre più importanti minacce per la salute pubblica del ventunesimo secolo, insieme alla crisi climatica e al negazionismo per i vaccini [1].

Un recente studio pubblicato nel 2022 ha stimato la mortalità globale associata a 33 specie batteriche considerando 11 sindromi infettive [2]. Lo studio stima che nel 2019 si sono verificati 13,7 milioni di decessi per infezioni a livello globale, dei quali 7,7 milioni associati alle 33 specie batteriche sia sensibili che resistenti agli antibiotici. I risultati mostrano che più della metà dei decessi sono stati causati da cinque principali batteri patogeni quali *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Questi batteri erano associati al 13,6% di tutti i decessi a livello globale e al 56,2% di tutte le morti per sepsi nel 2019. In particolare, lo *S. aureus* è stato associato a più di 1 milione di morti. Secondo questo studio, sei principali batteri patogeni (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*) hanno provocato 929.000 decessi

attribuibili alla resistenza agli antibiotici e 3,57 milioni di decessi associati alla resistenza agli antibiotici. In particolare, la combinazione patogeno-antibiotico, *S. aureus* con resistenza alla meticillina, ha causato più di 100.000 decessi.

I risultati di questo studio indicano che la resistenza dei batteri agli antibiotici è un problema di salute pubblica la cui dimensione è importante almeno quanto le principali malattie infettive, come HIV e malaria, e potenzialmente maggiore [3].

L'antibiotico-resistenza in ambito oftalmologico rappresenta un fenomeno in rapida espansione, ancora sottovalutato rispetto ad altre specialità mediche. Recenti studi hanno evidenziato un incremento significativo dei casi di resistenza batterica nelle infezioni oculari, con particolare attenzione alle congiuntiviti, alle cheratiti e alle blefariti, sia in ambito ambulatoriale che nella profilassi post-chirurgica.

Secondo una survey condotta su 150 oftalmologi italiani, il 98% dei partecipanti ha riscontrato fenomeni di antibiotico-resistenza in un range di pazienti compreso fra il 10% e il 30%, corrispondente a circa 50.000-100.000 pazienti all'anno. Questi dati suggeriscono una crescente incidenza del problema, con implicazioni significative per la salute pubblica e la pratica clinica.

Uno studio retrospettivo condotto su oltre 15.000 isolati oftalmici da pazienti trattati presso l'ospedale oftalmico di Torino tra il 1988 e il 2017 ha evidenziato un trend di resistenza crescente verso diverse classi di antibiotici, in particolare i fluorochinoloni e gli aminoglicosidi. Questi risultati sono in linea con quelli di studi internazionali, come il report ARMOR (Antibiotic Resistance Among Ocular Pathogens) condotto negli Stati Uniti tra il 2009 e il 2018, che ha documentato un aumento delle resistenze ai fluorochinoloni in diverse aree geografiche [4].

Le cause principali dell'antibiotico-resistenza in oftalmologia includono l'uso inappropriato e prolungato di antibiotici, la mancata aderenza alle linee guida terapeutiche e la profilassi antibiotica eccessiva, soprattutto nei pazienti sottoposti ad iniezioni intravitreali frequenti. Inoltre, la scarsa raccolta di campioni biologici oculari e la diagnosi empirica contribuiscono alla difficoltà nel monitorare e contrastare efficacemente la diffusione di ceppi resistenti.

Per affrontare questa problematica, è fondamentale implementare strategie di sorveglianza epidemiologica, promuovere l'uso razionale degli antibiotici, migliorare la formazione degli operatori sanitari e sensibilizzare i pazienti sull'importanza dell'aderenza alle terapie prescritte. Inoltre, è essenziale sviluppare nuovi agenti antimicrobici e alternative terapeutiche per contrastare le infezioni oculari causate da batteri resistenti.

Pertanto, l'antibiotico-resistenza in oftalmologia è un fenomeno in forte crescita che richiede un'azione coordinata tra professionisti sanitari, istituzioni e pazienti per prevenire e gestire efficacemente le infezioni oculari resistenti agli antibiotici.

Uno studio pubblicato recentemente ed effettuato su oltre 15.000 isolati oftalmici da pazienti trattati presso l'ospedale oftalmico di Torino tra il 1988 e il 2017 ha evidenziato come oltre il 70% delle infezioni oculari sia sostenuto da batteri Gram + [5]. In esso si è evidenziato un trend di resistenza importante ed in crescita verso diverse classi di antibiotici usati in oftalmologia, in primis fluorochinoloni (per i batteri Gram + e Gram -) ed aminoglicosidi (per i batteri Gram -).

L'American Academy of Ophthalmology (AAO) ha pubblicato recentemente un editoriale sul ruolo dell'antibiotico-resistenza in oftalmologia [6]. Da esso è emerso come sia ormai un problema mondiale, molto accentuato in quei Paesi che hanno fatto un uso estensivo di alcune classi di antibiotici (es. fluorochinoloni) negli ultimi dieci anni, evidenziando come alcuni pazienti che

eseguivano molte iniezioni intravitreali all'anno e che venivano per questo sottoposti a molte profilassi antibiotiche con i fluorochinoloni, sviluppavano resistenza verso questa classe di farmaci. Per questo motivo se ne consiglia l'uso solo per le infezioni gravi (endofalmiti), prediligendo per le comuni congiuntiviti e cheratiti batteriche, l'uso del Cloramfenicolo che ha dimostrato maggiore sensibilità.

In questa tesi, si analizzeranno le cause e le conseguenze dell'incongruo utilizzo di antibiotici, nonché le strategie necessarie per promuoverne un uso più responsabile e consapevole, al fine di preservare l'efficacia degli antibiotici per le future generazioni.

Capitolo 1

1.1 Antibiotico resistenza e suoi meccanismi d'azione

Il meccanismo dell'antibiotico resistenza si instaura nel momento in cui batteri precedentemente sensibili ad un particolare antibiotico sviluppano insensibilità nei suoi confronti, in seguito a mutazioni cromosomiche (resistenza cromosomica) o ad acquisizione di materiale genetico derivante da popolazioni batteriche correlate o meno a quella ricevente (resistenza trasferibile) [7]. La diffusione di mutazioni cromosomiche avviene attraverso trasmissione verticale e indipendentemente dalla presenza dell'antibiotico; generalmente queste mutazioni vengono corrette da meccanismi cellulari e per tale motivo sono rare.

Il fenomeno della resistenza trasferibile è invece più significativo e prevede la dislocazione di geni batterici in grado di conferire resistenza; tale trasferimento genico è mediato da plasmidi, integroni e trasposoni e può avvenire tra DNA cromosomiale ed extra-cromosomiale nell'ambito di batteri della stessa specie e non (trasmissione orizzontale), grazie ai processi di trasformazione, coniugazione e trasduzione [8, 9]. Questi permettono ai batteri riceventi di acquisire la capacità di attuare uno o più meccanismi di resistenza al fine di difendersi dall'attività antibiotica. Tali meccanismi possono essere classificati in base alla via biochimica coinvolta e prevedono la capacità di modificare la molecola antibiotica, di precludere il raggiungimento dei siti target, di modificare, proteggere, sostituire o bypassare i siti target.

L'inattivazione della molecola antibiotica può avvenire attraverso l'apporto di alterazioni chimiche o per mezzo della distruzione vera e propria della molecola. La produzione di enzimi in grado di apportare alterazioni chimiche a livello dell'antibiotico è un meccanismo di resistenza diffuso sia nei batteri Gram-negativi che in quelli Gram-positivi [10]. Gran parte degli antibiotici interessati appartengono alla classe di molecole che esplica il proprio

meccanismo d'azione inibendo la sintesi proteica a livello dei ribosomi e le reazioni più frequentemente catalizzate dagli enzimi coinvolti includono acetilazione (es. resistenza ad aminoglicosidi, cloramfenicolo, streptogramine), fosforilazione (es. resistenza ad aminoglicosidi e cloramfenicolo) e adenilazione (es. resistenza ad aminoglicosidi e lincosamidi) [11]. Indipendentemente dall'enzima coinvolto, l'effetto risultante si traduce in un ostacolo sterico che impedisce alla molecola il legame con il proprio bersaglio. La produzione di enzimi in grado di agire sull'antibiotico in modo tale da eliminarlo è invece ampiamente diffusa per quanto riguarda la resistenza ai beta-lattamici; numerosi batteri hanno infatti sviluppato la capacità di produrre enzimi definiti beta-lattamasi, in grado di distruggere il legame ammidico dell'anello beta-lattamico, rendendo quindi inefficace l'antibiotico.

Preclusione del raggiungimento del sito target

Attraverso la diminuzione della permeabilità della membrana o l'espulsione attiva dell'antibiotico per mezzo di pompe d'efflusso, la cellula batterica è in grado di precludere alla molecola antibiotica il raggiungimento del sito target. La riduzione delle permeabilità di membrana è regolata dalle porine e in particolar modo da variazioni nel loro numero a livello della membrana plasmatica o dalla produzione di porine specifiche, atte ad impedire la penetrazione dell'agente antibatterico (tra queste ricordiamo quelle prodotte da E.coli -OmpF, OmpC, PhoE- e da P. aeruginosa -proteina D2-) [10]. Il meccanismo di espulsione dell'antibiotico mediante pompe d'efflusso è stato rilevato sia in batteri Gram-positivi che in batteri Gram-negativi e può essere caratterizzato da pompe d'efflusso specifiche per un determinato antibiotico (es. pompe Tet per la tetracilina) o adatte a vari tipi di antibiotici (generalmente tipiche dei batteri MDR). È possibile identificare cinque famiglie di pompe d'efflusso (MFS -major facilitator superfamily-, SMR -small multidrug resistance-, RND -resistance nodulation division-, ABC -ATP-binding cassette-

e MATE -multidrug and toxic-compound extrusion) che si differenziano per conformazione strutturale, fonte energetica utilizzata, substrati espulsi ed organismi batterici in cui sono distribuiti [12].

Proteggendo il sito target, la cellula batterica impedisce all'antibiotico di raggiungere il sito di legame; tra gli antibiotici coinvolti in questo tipo di resistenza troviamo la tetraciclina e i fluorochinoloni. La protezione consiste generalmente nella rimozione dell'antibiotico dal sito di legame o nella produzione di proteine specifiche in grado di competere per lo stesso sito di legame della molecola antibiotica, che ne impediscano quindi l'interazione permettendo al batterio di sopravvivere [10, 13, 14].

L'azione antibiotica può essere inibita anche attraverso l'attuazione di modificazioni a livello del sito target, mediante mutazioni puntiformi nei geni che codificano per il sito target (es. resistenza alla rifampicina, ai fluorochinoloni e agli ossazolidinoni) o tramite la produzione di enzimi (es. resistenza a macrolidi, lincosamidi, streptogramina B in seguito a metilazione del sito di legame dell'antibiotico sul ribosoma batterico) [15, 16].

Sostituzione e bypass del sito target

La sostituzione del sito target consiste nello sviluppare nuove strutture in grado di svolgere funzioni biochimiche simili a quelle del target dell'antibiotico, con il vantaggio di non essere sensibili ad esso (es. resistenza alla meticillina e alla vancomicina). Inoltre, attraverso una sovrapproduzione del bersaglio, la cellula batterica è in grado di sopravvivere in presenza della molecola antibiotica, come avviene nel caso della resistenza a trimetoprim-sulfametossazolo [17].

Cause dell'antibiotico resistenza

Il problema della resistenza agli antibiotici è complesso poiché riconosce diverse cause. L'uso individuale non appropriato di antibiotici influenza inevitabilmente la salute dell'intera società, portando a fallimenti terapeutici

causati da batteri resistenti e superinfezioni date dalla diffusione di tali microrganismi all'interno delle strutture sanitarie e della comunità. L'uso non appropriato ed eccessivo degli antibiotici aumenta infatti la pressione selettiva sui batteri, favorendo l'insorgenza e la moltiplicazione di ceppi resistenti [18].

L'uso eccessivo di antibiotici in molteplici settori (umano, veterinario, agricolo e zootecnico) è la prima causa di tale problema, ma anche l'uso inappropriato, in termini di scelta inadeguata, dosaggio inadatto e scarsa aderenza alle linee guida per il trattamento [19, 20]. Il rischio a cui si va incontro attraverso questa pratica diffusa è quello del fallimento della terapia e la necessità di prescrivere ulteriori antibiotici che si presume possano essere efficaci per l'agente patogeno non identificato, sottoponendo il microbiota del paziente a una ripetuta ed intensa pressione selettiva, utile nello sviluppo di antibiotico-resistenza.

Altri fattori causali sono l'evoluzione batterica, misure comportamentali (autoprescrizione, automedicazione), economici (import-export di cibo), ambientali (inquinamento) e sociali (viaggi internazionali e intercontinentali), che contribuiscono alla diffusione della resistenza antimicrobica [21, 22].

La dispensazione di antibiotici senza prescrizione nelle farmacie comunitarie, che nel 2019 ha registrato una prevalenza globale complessiva del 62,2%, avviene generalmente in seguito alla richiesta di uno specifico antibiotico da parte del paziente o su raccomandazione del personale della farmacia stessa [22]. Frequente è poi l'assunzione diretta del farmaco, da parte dell'assistito e senza consulto medico, che può avvenire nel caso in cui il paziente possieda l'antibiotico in casa (avanzato da cicli terapeutici precedenti) o qualora il farmaco venga fornito da un parente o un amico [21]. Il fatto che sia il paziente stesso a decidere la tipologia di antibiotico, la dose e il tempo di assunzione, porta all'uso di un farmaco spesso non appropriato per l'infezione in corso, in

dosi non idonee e per tempi che sono generalmente inferiori rispetto a quelli necessari [23].

Infine, un'ulteriore pratica sempre più diffusa, sviluppatasi con il crescente utilizzo di Internet, è la possibilità di acquistare farmaci online, che rende ancora più complessa gestione e controllo del consumo di antibiotici e incoraggia l'automedicazione e la scarsa qualità della cura. Gli antibiotici venduti secondo questa modalità vengono forniti spesso senza la necessità di presentare una prescrizione medica o in seguito a diagnosi e prescrizioni online basate sulla storia clinica del paziente, promuovendo quindi uno standard di cura inappropriato [24, 25]. È bene specificare che questa attitudine all'acquisto ed al consumo non controllato degli antibiotici, varia in base al Paese considerato. In particolar modo, questo risulta essere un fenomeno maggiormente diffuso nei Paesi in via di sviluppo a causa della scarsa regolamentazione riguardante la vendita dei farmaci, delle pratiche di prescrizione inadeguate e della mancanza di farmacisti qualificati disponibili [26].

1.2 Antibiotico resistenza e ambiente

La diffusione di batteri resistenti nell'essere umano può avvenire attraverso varie modalità: l'ambiente, i vettori animali o per mezzo della trasmissione uomo-uomo.

Trasmissione ambiente-uomo

Particolarmente importante nel processo di trasmissione ambiente-uomo è il ruolo ricoperto dal trattamento delle acque reflue e dei rifiuti; gli antibiotici e i loro metaboliti possono infatti essere immessi nelle acque (es. fiumi, mari) e successivamente nel suolo, attraverso i rifiuti umani e quelli prodotti dalle industrie farmaceutiche. Tali composti, essendo attivi, sono in grado di svolgere la propria azione nei confronti dei batteri che popolano l'ambiente,

contribuendo così a renderli resistenti e aumentando il rischio di diffusione di tali microrganismi nell'uomo [27].

Trasmissione animale-uomo

Il potenziale di trasmissione di batteri resistenti dagli animali agli esseri umani è stato riconosciuto negli anni '60 ed è legato principalmente all'uso di tali farmaci in ambito zootecnico. La somministrazione di antibiotici agli animali all'interno degli allevamenti permette ai batteri residenti in essi di produrre resistenza che può quindi essere trasmessa all'essere umano. Tali batteri possono essere presenti all'interno delle feci, sulla pelle e nelle viscere degli animali e possono quindi essere trasmessi all'uomo in seguito a contatto stretto con essi (es. fattori o veterinari) o attraverso l'alimentazione [28].

Trasmissione uomo-uomo

La trasmissione uomo-uomo di ceppi batterici resistenti può avvenire in comunità o all'interno di strutture sanitarie e si verifica generalmente attraverso contatto diretto o indiretto (*droplets* o condivisione di superfici contaminate) tra individui infetti sintomatici o asintomatici, e individui non infetti. Una delle cause principali alla base della rapida diffusione di batteri resistenti all'interno della comunità è da ricercare nell'elevato tasso di spostamenti dato dai flussi migratori e dal turismo che creano, per gli agenti patogeni resistenti, nuove opportunità di condivisione del proprio materiale genetico con altri batteri, generando quindi nuovi ceppi resistenti ad una velocità senza precedenti [29]. Nonostante ciò, l'ambito in cui la trasmissione di batteri resistenti avviene con maggiore facilità e frequenza, rimane quello legato all'assistenza sanitaria all'interno di strutture ospedaliere e di cura. Mentre il numero dei batteri insensibili agli antibiotici continua a crescere, le lacune nei controlli delle infezioni all'interno delle strutture sanitarie ne facilitano la trasmissione tra i pazienti. La trasmissione da paziente a personale sanitario è la fonte primaria di diffusione di batteri resistenti in ambito ospedaliero e avviene attraverso la

contaminazione di mani, guanti e camici [30]. È quindi inevitabile che il personale sanitario disposto alle cure dell'assistito infetto sia esposto ai batteri resistenti e, attraverso visite ad altri pazienti, possa quindi permettere all'agente patogeno una rapida diffusione [31]. In particolar modo, un aspetto estremamente importante legato allo sviluppo e diffusione dell'AMR nelle strutture sanitarie riguarda le infezioni correlate all'assistenza (ICA) che rappresentano il 75% delle infezioni date da batteri resistenti [7]. Le ICA sono infezioni acquisite dal paziente durante il periodo di permanenza in ospedale o in altre strutture sanitarie e sono identificate come la più grave e frequente complicanza legata all'assistenza sanitaria. Le cause alla base di tali infezioni sono varie e comprendono l'introduzione di tecnologie sanitarie innovative che prevedono l'uso prolungato di dispositivi medici invasivi, l'attuazione di interventi chirurgici complessi che possono favorire l'ingresso di microrganismi in sedi corporee generalmente sterili, la scarsa applicazione di misure di igiene ambientale, l'immunosoppressione o gravi patologie concomitanti. Nello specifico, i fattori di rischio sono generalmente l'età superiore ai 65 anni, i ricoveri d'urgenza e in terapia intensiva, le degenze ospedaliere superiori ai 7 giorni e il posizionamento di catetere venoso centrale e urinario e del tubo endotracheale [32].

La maggior parte delle ICA legate all'AMR coinvolge il tratto urinario (gran parte delle infezioni ospedaliere è rappresentata da infezioni urinarie), l'apparato respiratorio e le ferite chirurgiche e porta spesso ad infezioni sistemiche [33]. Ad oggi le ICA date da batteri resistenti sono una delle prime cause di morte negli ospedali e una percentuale tra il 5% e il 15% dei pazienti ospedalizzati sviluppa un'infezione durante il ricovero; tra questi, coloro che si trovano in terapia intensiva hanno una probabilità fino a 10 volte maggiore di contrarre una ICA. Le ICA legate all'antibiotico-resistenza sono associate quindi a conseguenze quali l'aumento del tempo di permanenza nella struttura

sanitaria, un maggior rischio di contagio, morbilità, mortalità e l'aumento dei costi ospedalieri [34].

1.3 L'approccio 'One Health'

Nel 2001, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha descritto l'AMR come un problema globale che richiede una risposta globale [18]. L'approccio "One Health", definito dall'American Veterinary Medical Association nel 2008 come '[...] lo sforzo collaborativo di più discipline – che lavorano a livello locale, nazionale e globale - per raggiungere una salute ottimale per le persone, gli animali e l'ambiente [...]', ritiene che la salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente sia collegata come quella di un organismo unico. Oltre ad essere un problema di 'One Health', l'AMR è un problema di 'One World' a causa della globalizzazione del sistema di approvvigionamento alimentare, con un crescente movimento di bestiame e prodotti agricoli, combinato con un aumento dei viaggi internazionali ed intercontinentali, che facilita la rapida diffusione e la combinazione/associazione di geni di AMR emergenti [35]. Le aree di lavoro in cui un approccio 'One Health' è particolarmente rilevante includono la sicurezza alimentare, il controllo delle zoonosi, ovvero malattie che possono trasmettersi da animali all'uomo (salmonellosi non tifoidee) e la lotta alla resistenza agli antibiotici.

Capitolo 2

2.1 Il microbioma oculare

I recenti progressi nella conoscenza del microbioma umano, della sua importanza nel mantenimento dell'omeostasi che caratterizza i distretti mucosi e cutanei sani e del suo potenziale ruolo in molteplici patologie, hanno portato a studiare sotto questa nuova luce, anche la superficie oculare ed in particolare la popolazione microbica ivi stabilmente residente e la sua potenziale relazione con patologie infettive ed infiammatorie (o "idiopatiche") dell'occhio [36].

Il microbioma oculare è un ecosistema complesso, caratterizzato dalla presenza di diversi microrganismi che risiedono sulle superfici oculari, come la congiuntiva, la cornea, la palpebra e il film lacrimale. Tuttavia, sebbene la maggior parte dei microrganismi oculari siano innocui o addirittura protettivi, alcuni patogeni possono far parte del microbioma oculare, contribuendo a malattie infettive o infiammatorie [37].

I patogeni oculari, sebbene in minoranza rispetto ai microrganismi benefici, possono essere opportunisti, scatenando infezioni quando l'equilibrio del microbioma viene alterato da fattori come l'uso eccessivo di antibiotici, l'uso di lenti a contatto, traumi oculari o condizioni di immunosoppressione.

Tra i principali patogeni oculari troviamo *Staphylococcus aureus*, un batterio Gram-positivo che è una delle cause più comuni di infezioni oculari, come la blefarite e la congiuntivite. *Staphylococcus aureus* può colonizzare la pelle intorno agli occhi e, in condizioni di disbiosi, può invadere la superficie oculare, provocando infezioni più gravi, come la cheratite. Inoltre, alcune varianti di *S. aureus*, portatrici di geni di resistenza agli antibiotici come la meticillina (MRSA), rappresentano una seria preoccupazione per la salute oculare, poiché possono rendere il trattamento delle infezioni più difficile e complesso [38].

I CoNS sono i batteri più comunemente riscontrati, rilevati fino al 100% delle colture congiuntivali positive prelevate da pazienti in fase preoperatoria, con *Staphylococcus epidermis* come specie predominante [39]. Alcuni degli organismi commensali che comunemente costituiscono la flora oculare sono *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* [38, 39]. Gli studi che impiegano tecniche molecolari non coltivabili per determinare il microbioma oculare sono emersi solo di recente [40].

In uno studio che ha confrontato i risultati delle tecniche colturali convenzionali e del sequenziamento del 16S RNA (una tecnica di sequenziamento genico utilizzata per identificare filamenti di batteri in un campione), è stata identificata una gamma molto più ampia di organismi microbici utilizzando quest'ultima, con l'isolamento di *Rhodococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Propionibacterium* sp. ed *Erwinia* sp. [41] (Figura 1).

I vari studi hanno permesso di identificare 12 generi batterici che possono essere considerati come un “core” microbioma della superficie oculare, cioè dei generi presenti e ritrovabili anche in soggetti diversi. Tale core è costituito principalmente da batteri e in minima parte da virus e funghi e tra i generi identificati e riconosciuti come presenti a livello della superficie oculare ci sono anche generi che sono generalmente conosciuti come “patogeni” responsabili delle principali patologie della superficie oculare.

Il ruolo del microbioma a livello della superficie oculare può essere dunque analogo a quello di altri distretti dell'organismo (es. cute, intestino) ovvero la flora batterica commensale dialoga con le cellule epiteliali e immunitarie e coordina diverse funzioni volte al mantenimento dell'omeostasi e del benessere locale come la conservazione della barriera epiteliale, l'inibizione dell'apoptosi e dell'infiammazione, l'accelerazione della guarigione delle ferite, l'esclusione

competitiva di potenziali patogeni, il mantenimento dell'omeostasi della risposta immunitaria.

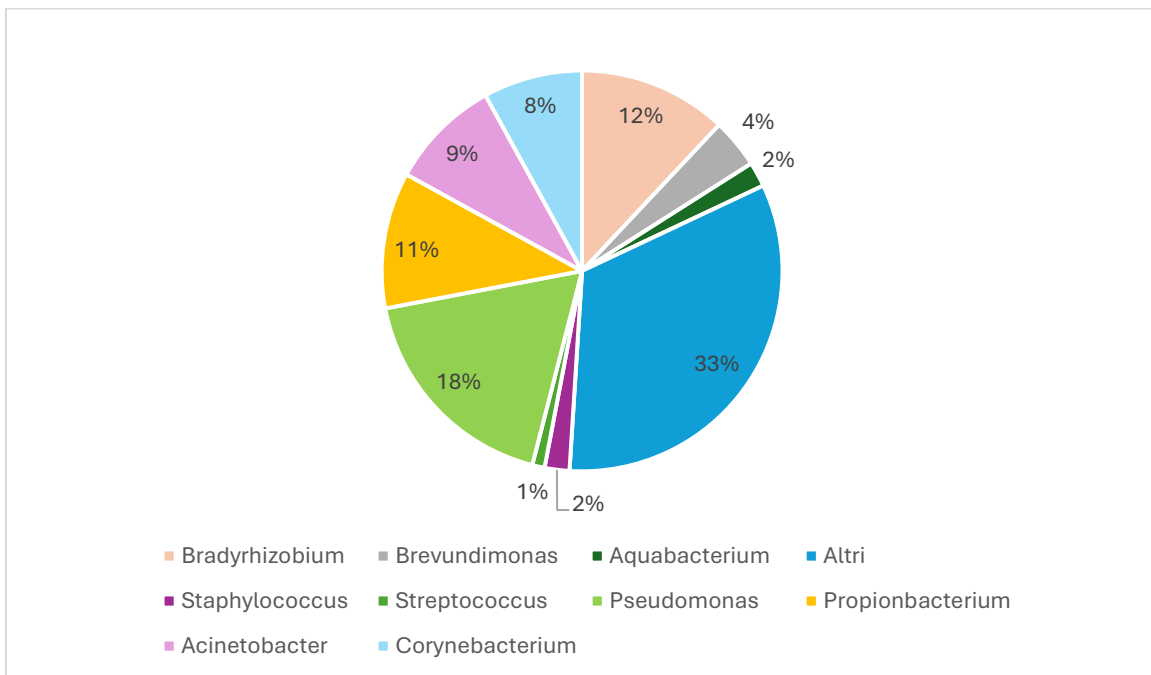


Figura 1: Caratterizzazione della popolazione batterica, divisa in potenziali patogeni e non patogeni, presenti in soggetti sani tra 25-46 anni (analisi della sequenza 16 SrRNA)

2.2 Antibiotico resistenza oculare

L'antibiotico-resistenza oculare rappresenta una crescente minaccia per la salute pubblica, complicando la gestione clinica delle infezioni oculari sia in ambito comunitario che nosocomiale. I principali patogeni coinvolti includono *Staphylococcus aureus* (inclusi ceppi meticillino-resistenti, MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* [42]. Questi microrganismi sono spesso responsabili di congiuntiviti, cheratiti, endoftalmiti e blefariti. Studi recenti, come il *ARMOR study* (Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular Microorganisms), hanno evidenziato alti tassi di resistenza a fluorochinoloni (es. levofloxacin, moxifloxacin), macrolidi (es. eritromicina) ed, in misura

crescente, aminoglicosidi (come la tobramicina), specialmente nei ceppi di *S. aureus* e *S. epidermidis* [43]. Il fenomeno della multiresistenza è aggravato dall'uso empirico e ripetuto di antibiotici topici, spesso prescritti senza antibiogramma, e dall'inadeguata penetrazione oculare di alcuni agenti antimicrobici, che può favorire la selezione di cloni resistenti [44].

In questo contesto, l'integrazione di antisettici topici nelle pratiche cliniche e chirurgiche rappresenta una strategia fondamentale per ridurre l'uso inappropriato di antibiotici, specialmente nella profilassi pre- e post-operatoria della chirurgia oftalmica. Gli antisettici, a differenza degli antibiotici, possiedono un ampio spettro d'azione e un minor rischio di selezione di ceppi resistenti. Tra i più utilizzati in oftalmologia, la povidone-iodio (PI) al 5–10% rappresenta lo standard di riferimento per la disinfezione preoperatoria della superficie oculare e delle palpebre grazie alla sua elevata efficacia battericida, virucida e fungicida [45]. Più recentemente, l'impiego della poli-esametilenebiguanide (PHMB) e dell'acido ipocloroso è stato esplorato in soluzioni oftalmiche a concentrazioni inferiori (es. 0.02–0.04%), dimostrando buona tollerabilità e attività antimicrobica anche contro biofilm batterici [46, 47]. L'integrazione sistematica di questi antisettici, soprattutto in chirurgia della cataratta e chirurgia refrattiva, è sostenuta da linee guida internazionali e si propone come un'alternativa efficace per limitare la prescrizione empirica di antibiotici topici, contribuendo alla lotta globale contro l'antibiotico-resistenza.

2.3 L'olio ozonizzato liposomiale e sue applicazioni in oftalmologia

L'ozono è un gas altamente instabile che si forma nella stratosfera per l'azione delle radiazioni ultraviolette sull'ossigeno biatomico (O_2) che viene scisso e ricombinato in una nuova forma allotropica a 3 atomi [48, 49].

L'ozono ha un elevato potenziale di ossidazione (è uno degli ossidanti più potenti che si conoscano); questa caratteristica è sfruttata da anni in medicina attraverso l'impiego dell'ozono in forma gassosa (ottenuto da particolari

apparecchi medicali chiamati ozonizzatori) per via sottocutanea, intramuscolare, intrarticolare, endovenosa nel trattamento di affezioni neurologiche, vascolari, reumatologiche, odontostomatologiche e dermatologiche [50, 51].

L'instabilità dell'ozono non lo rende adatto per alcuni tipi di trattamenti topici, come quelli oculari, né impiegato come tale (in forma gassosa) né in soluzione acquosa: insufflato in acqua, infatti, la sua concentrazione si riduce rapidamente con una cinetica di primo ordine e una emivita di pochi minuti, dipendente dalla temperatura esterna. Questo significa che in poche ore non resta praticamente ozono attivo in soluzione [52].

Nonostante questa sua instabilità intrinseca, l'ozono gassoso può essere stabilizzato per uso topico attraverso la reazione di O_3 con il doppio legame di acidi grassi naturali come quelli contenuti negli oli di girasole o oliva, formando oli ozonizzati stabili che contengono molecole attive chiamate ozonidi (o ozonuri) [53]. Questo processo è conosciuto come reazione di Criegee, e gli ozonidi sono anche indicati come intermedi di Criegee [54].

Gli ozonidi sono stabili e possono essere impiegati per la preparazione di formulazioni per uso topico con attività antibatteriche, antivirali e antifungine, immunostimolanti e stimolanti la guarigione tissutale per il trattamento di ferite, infezioni da anaerobi, infezioni erpetiche (HSV I e II), ulcere trofiche, ascessi, piaghe da decubito, patologie fungine [55].

L'olio ozonizzato in liposomi rappresenta una promettente soluzione antisettica per l'antisepsi della superficie oculare in preparazione alla chirurgia oftalmica, grazie alle sue spiccate proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie e rigenerative. L'ozono (O_3), in forma stabilizzata all'interno di oli vegetali insaturi (come l'olio di girasole o di oliva), viene incapsulato in liposomi, strutture fosfolipidiche biocompatibili che ne migliorano la biodisponibilità e

la penetrazione a livello dell'epitelio oculare, garantendo un rilascio graduale e controllato del principio attivo [51, 56].

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dell'olio ozonizzato nel ridurre la carica batterica su superfici biologiche, inclusa la congiuntiva, contro un ampio spettro di patogeni, comprese le forme multiresistenti quali *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* [55, 57]. Il meccanismo d'azione dell'ozono si basa sull'ossidazione dei fosfolipidi e delle proteine delle membrane microbiche, causando lisi cellulare irreversibile senza indurre fenomeni di resistenza crociata agli antibiotici convenzionali [52, 58]. Inoltre, i liposomi agiscono come veicoli ottimali, mimando la composizione delle membrane cellulari e facilitando l'interazione con i tessuti oculari, migliorando la tollerabilità del preparato.

Oltre all'effetto antimicrobico, l'olio ozonizzato in liposomi stimola i processi di riparazione tissutale e rigenerazione epiteliale, aumentando l'espressione di fattori antiossidanti endogeni e modulando la risposta infiammatoria locale, proprietà di particolare rilievo in un contesto chirurgico [59, 60]. Tali effetti contribuiscono alla protezione dell'occhio da infezioni post-operatorie, come congiuntivite, blefarite e raramente endoftalmite, senza alterare significativamente la flora commensale oculare.

In virtù della sua efficacia, sicurezza e della mancanza di effetti collaterali sistemici o locali rilevanti, l'impiego dell'olio ozonizzato in liposomi si configura come un'alternativa ecocompatibile e priva di antibiotici, allineata con le raccomandazioni internazionali per la riduzione dell'impiego di antimicrobici in ambito chirurgico [61, 62]. Pertanto, il suo utilizzo nella profilassi pre-operatoria in chirurgia oftalmica può rappresentare una strategia innovativa e sostenibile per contrastare l'antibiotico-resistenza.

Capitolo 3

3.1 Materiali e Metodi

Disegno dello studio

È stato eseguito uno studio prospettico, interventistico, non randomizzato condotto su 100 pazienti sottoposti a chirurgia della cataratta tra gennaio e settembre 2024 presso l'AOU Federico II di Napoli in collaborazione con il Dipartimento di Medicina e Scienze della salute Vincenzo Tiberio - Università degli studi del Molise. Al momento del reclutamento, tutti gli occhi sono stati sottoposti ad un esame oculistico completo.

Criteri di inclusione

1. Età superiore a 18 anni.
2. Pazienti eleggibili per intervento di cataratta.
3. Disponibilità a partecipare allo studio seguendo le indicazioni.
4. Diagnosi di infezioni urinarie ricorrenti trattate con antibiotico sistemico per il Gruppo 1.
5. Nessuna terapia antibiotica sistemica per il Gruppo 2.

Criteri di esclusione

1. Uso di antibiotici topici e/o sistemici e altri antisettici topici durante lo studio.
2. Processi infiammatori/infettivi oculari o sistemici in corso.
3. Ipersensibilità ai costituenti del preparato in studio.
4. Pazienti con malattie autoimmuni.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato per la partecipazione allo studio.

Suddivisione dei gruppi

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi:

- **Gruppo 1 (gruppo di studio):** 50 pazienti che sono stati sottoposti ad almeno 5 cicli di antibiotici sistemici per il trattamento di cistiti ricorrenti negli ultimi dodici mesi.
- **Gruppo 2 (gruppo di controllo):** 50 pazienti che non hanno effettuato alcuna terapia antibiotica sistemica negli ultimi dodici mesi.

Procedure

1. Tampone congiuntivale:

- Al tempo T0 (prima dell'inizio del trattamento con antisettico topico), è stato eseguito un tampone congiuntivale in entrambi i gruppi.
- Al tempo T3, immediatamente prima dell'intervento di cataratta, è stato effettuato un secondo tampone congiuntivale.

2. Trattamento con antisettico topico:

I pazienti hanno instillato nell'occhio da operare un collirio antisettico a base di olio ozonizzato 0,5% in liposomi (1 goccia 4 volte al giorno ogni 4 alle ore: 9:00, 13:00, 17:00; 21:00) per tre giorni prima dell'intervento.

3. Conservazione e invio dei campioni:

I tamponi prelevati sono stati mantenuti a temperatura controllata (+2°C / +7°C) ed inviati al laboratorio di microbiologia entro 24 ore per l'analisi microbiologica. I batteri identificati sono stati testati per la sensibilità a diverse classi di antibiotici quali: fluorochinoloni, aminoglicosidi, macrolidi, cloramfenicolo e cefalosporine. Il metodo della diffusione su agar (Kirby-Bauer) è stato utilizzato per determinare la resistenza antibiotica.

Analisi microbiologica

I campioni prelevati sono stati inviati al laboratorio di microbiologia per la valutazione dei patogeni presenti sulla superficie congiuntivale, con un focus particolare sui batteri resistenti.

Endpoint Primari

Per ciascun paziente, sono stati effettuati tamponi congiuntivali al tempo 0 e al tempo 3 per la coltura batterica e la successiva identificazione dei batteri presenti. I ceppi batterici sono stati testati per la sensibilità a una serie di antibiotici di uso comune (fluorochinoloni, aminoglicosidi, macrolidi, cloramfenicolo, cefalosporine), utilizzando il metodo della diffusione su agar (Kirby-Bauer), per valutarne la resistenza.

Endpoint Secondari

1. Riduzione della carica batterica: L'efficacia del trattamento antisettico sulla riduzione della carica batterica della superficie oculare è stata valutata mediante coltura dei tamponi pre e post trattamento antisettico a base di ozono liposomiale in entrambe le popolazioni di pazienti
2. Efficacia del trattamento: L'incidenza di infezioni oculari nel periodo post-operatorio è stata monitorata e confrontata tra i due gruppi.
3. Tollerabilità del trattamento: Le complicanze associate con la somministrazione del collirio antisettico sono state registrate. L'iperemia congiuntivale è stata stadiata in 5 livelli clinici di gravità: 0= assente, 1 = molto lieve, 2= lieve, 3= moderata e 4= severa. Altri sintomi indagati sono stati: prurito, bruciore, sensazione di corpo estraneo nei giorni successivi al trattamento. La soddisfazione dei pazienti per il trattamento è stata valutata mediante una scala VAS a 10 punti (0= molto confortevole, 1-3= lieve discomfort, 4-6= moderato discomfort, 7-10= severo discomfort) alla visita di controllo dopo la terapia.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando test statistici appropriati (ad esempio, test T di Student o test Mann-Whitney, a seconda della distribuzione dei dati). Le comparazioni sono state effettuate tra i due gruppi in termini di prevalenza batterica e resistenza agli antibiotici.

3.2 Risultati

Identificazione dei patogeni oculari

Nel corso dello studio sono stati identificati otto principali patogeni batterici isolati dalle colture congiuntivali eseguite nei due gruppi di pazienti (G1: pazienti con anamnesi di antibiotico sistemico, G2: pazienti naïve). I ceppi più frequentemente isolati al tempo T0 in entrambi i gruppi sono risultati essere:

- *Staphylococcus epidermidis* (G1: 40%, G2: 44%)
- *Corynebacterium spp.* (G1: 18%, G2: 14%)
- *Staphylococcus aureus* (G1: 10%, G2: 6%)

Questi dati confermano il ruolo predominante della flora batterica commensale della superficie oculare (in particolare coagulasi-negativi come *S. epidermidis*), frequentemente implicata anche in infezioni post-operatorie in soggetti immunocompromessi o sottoposti a chirurgia intraoculare.

Ceppi opportunisti e potenzialmente più virulenti, come *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella spp.*, sono stati identificati in minoranza, evidenziando comunque una loro presenza nel microbiota oculare anche in soggetti asintomatici, soprattutto nel gruppo con storia antibiotica.

Dopo 3 giorni di trattamento antisettico con olio ozonizzato, è stata osservata una riduzione marcata della presenza di tutti i patogeni isolati, con l'abbattimento quasi completo di *P. aeruginosa*, *Moraxella spp.* e *Klebsiella spp.* in entrambi i gruppi. Questa osservazione suggerisce una spiccata efficacia

batterricida del collirio a base di ozono liposomiale, indipendentemente dalla storia antibiotica del paziente. (Tabella1) (Figura 2a-2b)

Specie Batterica	G1 T0 (%)	G1 T3 (%)	G2 T0 (%)	G2 T3 (%)
Staphylococcus epidermidis	40	20	44	12
Corynebacterium spp.	18	6	14	2
Staphylococcus aureus	10	2	6	2
Pseudomonas aeruginosa	5	0	2	0
Moraxella spp.	3	0	2	0
Klebsiella spp.	2	0	0	0
Altri (es. Enterococcus, Proteus)	22	6	12	0

Tabella 1: Ceppi batterici aT0 e aT3 nel gruppo 1 e nel gruppo 2

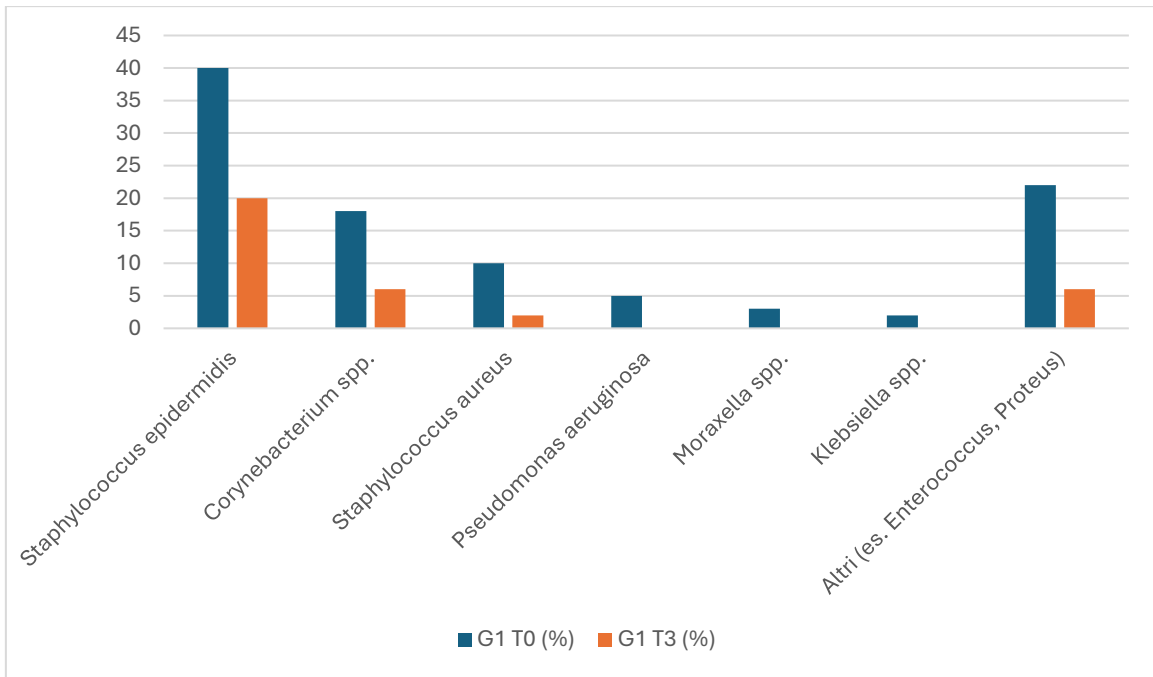


Figura 2a: Ceppi batterici T0 e T3 nel gruppo 1

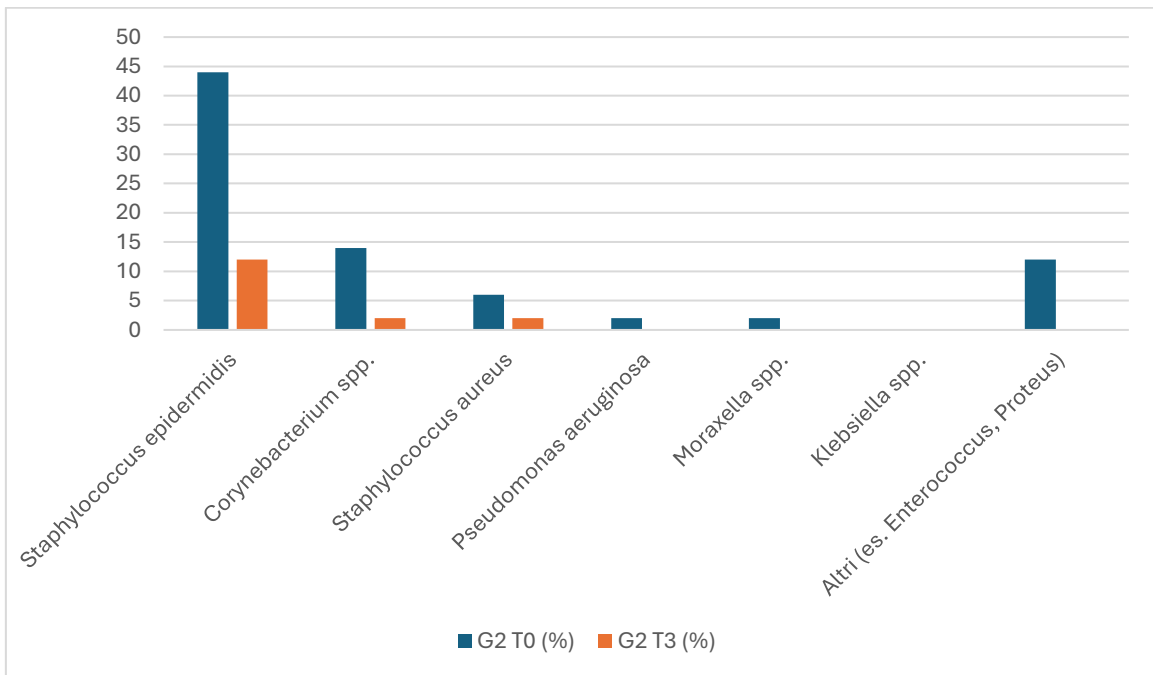


Figura 2b: Ceppi batterici a T0 e T3 nel gruppo 2

Resistenza agli antibiotici

L'antibiogramma dei ceppi isolati ha rivelato un profilo di resistenza significativamente più elevato nel Gruppo 1, coerentemente con l'anamnesi di esposizione ripetuta a terapia antibiotica sistemica. La resistenza ai fluorochinoloni è risultata la più frequente:

- **Fluorochinoloni:** resistenza nel 30% dei ceppi isolati nel Gruppo 1, rispetto al 15% nel Gruppo 2;
- **Aminoglicosidi:** 20% vs 12%;
- **Macrolidi:** 18% vs 10%;
- **Cloramfenicolo:** 12% vs 5%;
- **Cefalosporine:** 25% vs 18%.

Questi risultati evidenziano una possibile pressione selettiva esercitata dagli antibiotici sistemici, con comparsa di ceppi resistenti anche a farmaci oftalmici, ponendo attenzione al rischio di cross-resistenza (*Figura 3*).

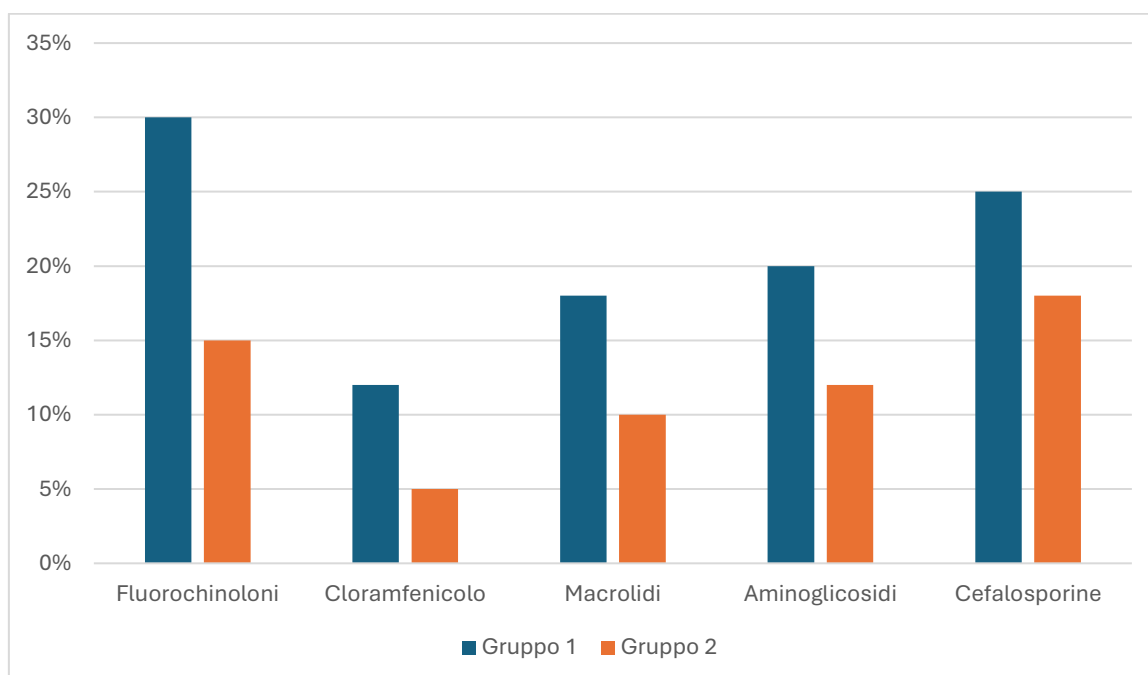


Figura 3: Antibiogramma pre-trattamento T0-% Resistenza

Riduzione della carica batterica

Il trattamento antisettico topico ha determinato una riduzione significativa della carica batterica oculare in entrambi i gruppi:

- Gruppo 1: da 3.1 a 1.0 log₁₀ CFU/ml (riduzione del 68%);
- Gruppo 2: da 2.9 a 1.0 log₁₀ CFU/ml (riduzione del 65%).

Nonostante la differenza leggermente superiore nel Gruppo 1, l'analisi statistica ($p = 0.38$) non ha mostrato significatività, indicando che l'effetto dell'ozono liposomiale è equivalente nei due gruppi, con ottima capacità battericida in entrambi i contesti clinici.

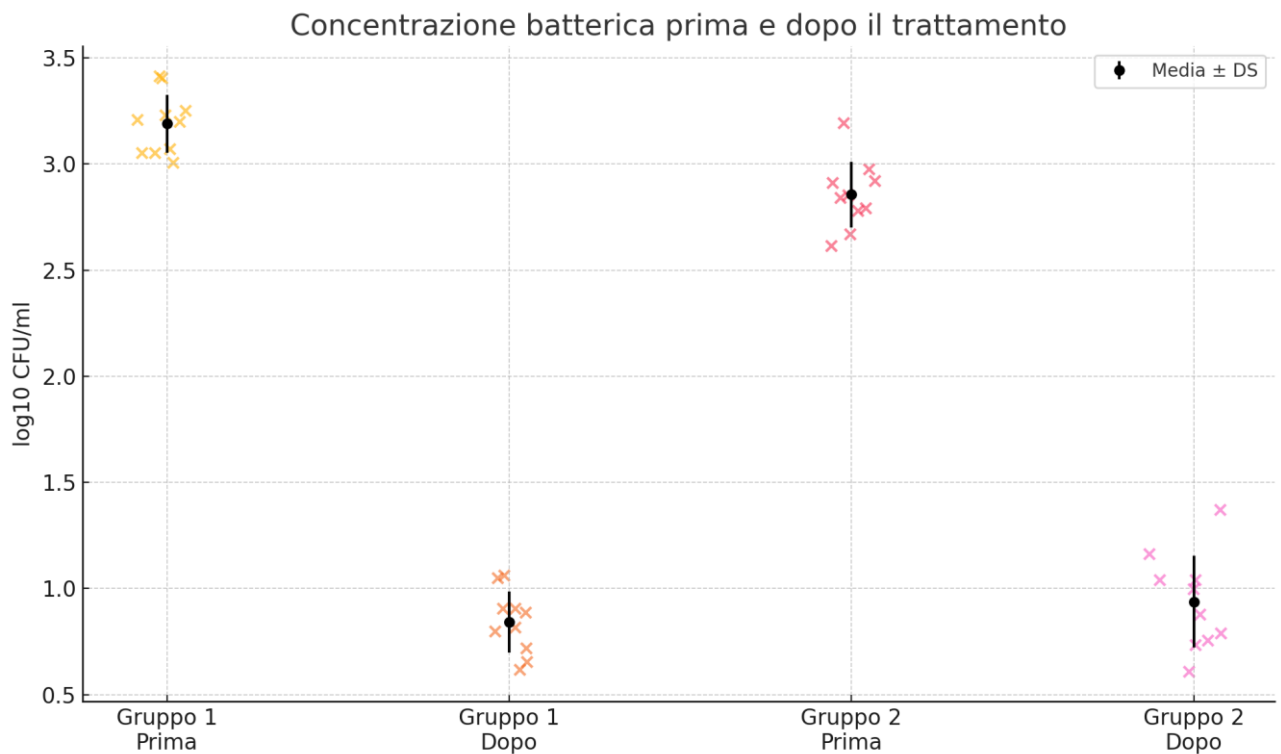


Figura 4: Distribuzione della concentrazione batterica prima e dopo il trattamento per i due gruppi.

Il grafico a dispersione con barre di errore mostra le concentrazioni batteriche (\log_{10} CFU/ml) prima e dopo il trattamento per i due gruppi. Le riduzioni sono visibili in entrambi i casi, con una variazione media significativa. (Figura 4)

I risultati dei test t indicano che le riduzioni sono statisticamente significative:

- Gruppo 1: $p \approx 4.06 \times 10^{-18}$;
- Gruppo 2: $p \approx 2.58 \times 10^{-14}$.

Incidenza di infezioni oculari post-operatorie

Durante i 30 giorni successivi all'intervento di cataratta, l'incidenza di infezioni oculari è risultata bassa e simile nei due gruppi:

- Gruppo 1: 4% (2/50 pazienti);
- Gruppo 2: 6% (3/50 pazienti).

La differenza non è risultata statisticamente significativa ($p = 0.57$). Tali dati supportano l'ipotesi che il trattamento antisettico sia altrettanto efficace nella prevenzione delle complicanze infettive post-chirurgiche in pazienti con differente background antibiotico.

Tollerabilità del trattamento

La somministrazione topica del collirio a base di olio ozonizzato è risultata ben tollerata in entrambi i gruppi. I sintomi oculari riferiti sono stati lievi, autolimitanti e clinicamente trascurabili:

- Gruppo 1: 12% dei pazienti (6/50);
- Gruppo 2: 10% dei pazienti (5/50).

Non sono state segnalate reazioni avverse gravi o eventi avversi sistemici. Il p-value (0.76) conferma assenza di differenze significative tra i due gruppi.

Solo in 11 pazienti dei 100 in studio sono stati segnalati eventi avversi topici nell'occhio trattato, limitati a iperemia congiuntivale appena rilevabile (grado 1). L'accettazione del trattamento è stata ottimale, considerando che 92 pazienti hanno reputato il trattamento come “molto confortevole”, mentre 7 hanno segnalato un lieve discomfort e solo 2 un discomfort moderato.

(a)Eventi avversi oculari	0 Normale	1 Molto lieve	2 Lieve	3 Moderato	4 Severo	P <0,0001
Iperemia congiuntivale	89 (89%)	11(11%)	0	0	0	
Secrezione oculare	0	0	0	0	0	0
Cheratiti	0	0	0	0	0	0
Dolore oculare	0	0	0	0	0	0

(b)VAS	Molto confortevole	Discomfort lieve	Discomfort moderato	Discomfort severo	P
Comfort (%)	92	7	2	0	<0,0001

Tabella 2: (a) Incidenza e stadiazione degli eventi avversi oculari e (b) valutazione del comfort del trattamento topico

Sintesi dei risultati

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano che:

- il trattamento con olio ozonizzato è efficace nel ridurre la flora batterica oculare preoperatoria, incluse specie potenzialmente patogene;
- è stato osservato un profilo di resistenza antibiotica più elevato nei pazienti con storia di terapie antibiotiche sistemiche;
- l'efficacia clinica dell'antisettico e la prevenzione delle infezioni post-operatorie si sono dimostrate comparabili nei due gruppi;
- la tollerabilità del trattamento è risultata elevata e non influenzata dalla storia terapeutica sistemica.

Questi dati supportano l'utilizzo routinario di antisettici ad ampio spettro non antibiotici in preparazione alla chirurgia oftalmica, in un'ottica di contenimento dell'antibiotico-resistenza e sicurezza del paziente.

Capitolo 4

Discussione

La sfida posta dall'antibiotico-resistenza interessa l'intera popolazione mondiale ed è necessario che venga affrontata a livello globale, all'interno di ogni territorio e attraverso il coinvolgimento di un'ampia sfera di settori. Tale approccio è generalmente identificato dal modello sanitario "One Health", basato sull'integrazione di diverse discipline e volto alla progettazione e all'attuazione di programmi, politiche, normative e ricerche, finalizzate al raggiungimento di migliori livelli di salute globale [35]. Per poter affrontare tale emergenza, in quanto problema comune, ogni Paese deve quindi impegnarsi ad agire su vari fronti quali:

- rafforzare i sistemi sanitari e la loro capacità di sorveglianza;
- garantire l'accessibilità agli antibiotici appropriati;
- promuovere un corretto utilizzo;
- rispettare la regolamentazione e la legislazione legate a vendita e produzione;
- incoraggiare soluzioni innovative all'uso di tali farmaci.

La sorveglianza del fenomeno dell'antibiotico-resistenza è di fondamentale importanza per fornire informazioni riguardo l'entità e le tendenze della resistenza agli antibiotici in un determinato territorio e per un tempo definito, attraverso il controllo del consumo, dell'utilizzo che ne viene fatto da parte dei pazienti e degli operatori sanitari e dell'efficacia degli interventi attuati. L'obiettivo ultimo della sorveglianza sul consumo di antibiotici e sull'AMR è infatti quello di fornire informazioni, approfondimenti e strumenti necessari ad attuare interventi di contenimento della stessa a livello locale, nazionale e globale.

L'antibiotico-resistenza rappresenta una delle sfide più critiche per la sanità pubblica mondiale del XXI secolo. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si stima che entro il 2050 le infezioni da microrganismi resistenti agli antibiotici potrebbero causare fino a 10 milioni di decessi ogni anno, superando il numero delle morti per cancro [61]. In questo contesto, l'uso profilattico e talvolta indiscriminato degli antibiotici in ambito chirurgico oftalmologico solleva serie preoccupazioni, sia per l'inefficacia clinica nei confronti di ceppi resistenti, sia per la potenziale selezione di nuove popolazioni batteriche multi-resistenti [63, 64].

Nel presente studio prospettico, abbiamo indagato sull'efficacia di un collirio antisettico a base di olio ozonizzato in liposomi 0,5%, confrontandone gli effetti sulla flora batterica oculare e sugli esiti post-operatori in due gruppi di pazienti candidati a chirurgia della cataratta, con e senza esposizione pregressa a cicli ripetuti di antibiotici sistemici. I risultati ottenuti dimostrano in modo chiaro che l'utilizzo dell'antisettico topico ha indotto una riduzione significativa e comparabile della carica microbica oculare in entrambi i gruppi, senza differenze statisticamente significative nei tassi di infezione post-chirurgica o nella tollerabilità del trattamento.

4.1 Flora batterica oculare e implicazioni cliniche nella profilassi perioperatoria

La superficie oculare, pur essendo esposta costantemente all'ambiente esterno, mantiene un equilibrio microbico dinamico grazie a una flora batterica residente che svolge un ruolo protettivo, contribuendo alla competizione per i nutrienti e alla stimolazione della risposta immunitaria locale. Tale microbiota è costituito prevalentemente da cocchi Gram-positivi, tra cui *Staphylococcus epidermidis* - il più frequentemente isolato - *Corynebacterium spp.* e, in misura minore, *Staphylococcus aureus* [65, 66]. Questi microrganismi, normalmente

commensali, possono tuttavia acquisire caratteristiche patogene in presenza di fattori predisponenti.

Situazioni cliniche come la chirurgia intraoculare, l'immunosoppressione sistemica o locale, la disfunzione del film lacrimale e l'esposizione pregressa o reiterata ad antibiotici topici o sistemici alterano l'omeostasi della superficie oculare, facilitando la selezione e la persistenza di ceppi potenzialmente patogeni o resistenti. In questo contesto, la transizione da uno stato di commensalismo a uno stato di virulenza è favorita, portando all'insorgenza di infezioni come blefarocongiuntiviti, cheratiti o, nei casi più gravi, endoftalmiti post-operatorie, che rappresentano emergenze oftalmologiche ad alto rischio di compromissione visiva [67].

La profilassi antibiotica topica pre-operatoria è stata storicamente adottata per ridurre la carica batterica congiuntivale e perioculare al fine di minimizzare il rischio di contaminazione intraoperatoria, specialmente durante interventi ad alta vulnerabilità come la chirurgia della cataratta o la chirurgia vitreoretinica. I farmaci di elezione più comunemente impiegati includono i fluorochinoloni (es. moxifloxacin, levofloxacin) e gli aminoglicosidi (es. tobramicina), grazie al loro ampio spettro d'azione e buona penetrazione tissutale [68].

Tuttavia, l'uso estensivo e spesso non guidato da test di sensibilità ha favorito l'emergere di ceppi resistenti, compromettendo l'efficacia di questa strategia profilattica. Numerose evidenze microbiologiche e cliniche hanno documentato un incremento progressivo dei tassi di resistenza, in particolare verso i fluorochinoloni, con isolamento di ceppi multiresistenti anche tra i comuni patogeni oculari [69-71]. Questo fenomeno è attribuibile alla pressione selettiva esercitata da cicli ripetuti di terapia antibiotica, che seleziona cloni batterici portatori di meccanismi di resistenza acquisiti (es. mutazioni nei geni *gyrA/parC*, pompe di efflusso, enzimi modificanti) e favorisce il trasferimento orizzontale di geni resistenti all'interno del microbiota oculare.

Alla luce di ciò, si rende necessaria una revisione critica delle pratiche profilattiche in oftalmologia, con particolare attenzione al bilanciamento tra efficacia antimicrobica e rischio di indurre resistenze, e una maggiore valorizzazione di approcci alternativi o integrativi, come l'utilizzo di antisettici ad ampio spettro.

4.2 Antibiotico-resistenza: una minaccia crescente anche in oftalmologia

L'antibiotico-resistenza rappresenta una delle più gravi minacce alla salute pubblica globale secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, con implicazioni rilevanti anche in ambito oftalmologico. L'utilizzo frequente e spesso empirico di antibiotici topici, in particolare fluorochinoloni, ha contribuito in modo sostanziale alla selezione di ceppi batterici resistenti, sia nei contesti ospedalieri che nella pratica ambulatoriale [72, 73]. Questa tendenza è particolarmente preoccupante considerando che molte infezioni oculari richiedono un trattamento tempestivo per prevenire complicanze gravi come la cheratite ulcerativa o l'endofthalmitis.

Numerose indagini microbiologiche condotte negli ultimi anni hanno documentato un incremento significativo della resistenza ai fluorochinoloni tra i comuni patogeni oculari. In particolare, *Staphylococcus epidermidis* - frequentemente riscontrato nella flora congiuntivale e principale responsabile di endofthalmitis post-operatoria - ha mostrato tassi di resistenza ai fluorochinoloni superiori al 20% in diversi studi multicentrici [74]. Questo dato è allarmante, poiché l'*S. epidermidis*, pur essendo un commensale, può acquisire rapidamente geni di resistenza attraverso trasferimento orizzontale, specialmente in ambienti ospedalieri.

Un altro patogeno rilevante è *Pseudomonas aeruginosa*, noto per la sua intrinseca resistenza a numerose classi antibiotiche e la capacità di sviluppare rapidamente fenotipi multiresistenti. Sebbene meno frequentemente isolato, *P. aeruginosa* è stato associato a quadri clinici particolarmente aggressivi,

specialmente in pazienti immunocompromessi o esposti a cicli ripetuti di antibiotici sistemici o topici [75, 76]. La resistenza nei confronti dei carbapenemi e delle cefalosporine di terza generazione, osservata in alcuni ceppi, limita ulteriormente le opzioni terapeutiche disponibili.

Nel nostro studio, l'analisi comparativa tra i gruppi ha evidenziato un chiaro impatto dell'anamnesi di antibiotico-terapia sistemica sul profilo di sensibilità microbica. I ceppi isolati dai pazienti del Gruppo 1 (con pregressa esposizione sistemica agli antibiotici) hanno mostrato percentuali di resistenza significativamente più elevate, con un'incidenza del 30% verso i fluorochinoloni e del 25% verso le cefalosporine, rispetto ai valori rispettivi del 15% e 18% nel Gruppo 2. Tali risultati sono coerenti con la letteratura internazionale, che descrive una correlazione positiva tra pressione selettiva antibiotica e comparsa di ceppi resistenti [77].

Questo scenario sottolinea l'urgenza di adottare strategie di stewardship antimicrobica anche in oftalmologia, promuovendo un uso razionale degli antibiotici e incoraggiando l'adozione di approcci alternativi come gli antisettici topici o l'ozono-terapia. Inoltre, si rende necessario il monitoraggio continuo della sensibilità antibiotica della flora batterica oculare, nonché la revisione periodica dei protocolli terapeutici perioperatori, al fine di contenere il rischio di fallimento terapeutico e di complicanze infettive gravi.

4.3 Meccanismi molecolari di resistenza nella flora oculare residente

La crescente prevalenza di ceppi resistenti tra i batteri commensali della superficie oculare rappresenta una sfida emergente, poiché tali microrganismi possono fungere da serbatoio genetico di resistenza e facilitare la diffusione di determinanti resistenti a patogeni opportunisti. A livello molecolare, la resistenza agli antibiotici più comunemente utilizzati in oftalmologia, in particolare ai fluorochinoloni, è spesso mediata da mutazioni puntiformi nei geni codificanti per la DNA girasi (*gyrA*) e la topoisomerasi IV (*parC*), enzimi

bersaglio dell'azione del farmaco. Queste mutazioni riducono l'affinità degli antibiotici per i loro siti di legame, determinando un'elevata resistenza clinica [78].

Oltre ai meccanismi target-specifici, sono state identificate anche resistenze basate sull'iperespressione di pompe di efflusso multidrug-resistance (MDR), come *NorA* in *Staphylococcus epidermidis*, che espellono attivamente gli antibiotici dalla cellula batterica, riducendone la concentrazione intracellulare [79]. Inoltre, nei ceppi di *Corynebacterium* e *Staphylococcus aureus* si osserva frequentemente la presenza di geni di resistenza acquisiti, trasportati su elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni o isole genomiche, facilitando il trasferimento orizzontale tra diverse specie batteriche [80].

Un'ulteriore criticità è rappresentata dalla capacità della flora batterica oculare di formare biofilm, strutture tridimensionali protettive che aumentano la tolleranza agli antibiotici e ostacolano la penetrazione dei principi attivi. Il biofilm oculare, spesso formato in seguito a interventi chirurgici o in presenza di dispositivi intraoculari (come lenti IOL), è stato implicato nella persistenza di infezioni croniche e refrattarie al trattamento antibiotico convenzionale [81].

Questi meccanismi evidenziano la necessità di un monitoraggio costante del profilo di sensibilità antimicrobica nella popolazione batterica oculare e l'importanza di strategie profilattiche mirate e personalizzate, che tengano conto non solo dell'efficacia clinica ma anche dell'impatto microbiologico a lungo termine.

4.4 Antisettici come alternativa sostenibile: evidenze e prospettive

L'utilizzo di antisettici topici non antibiotici sta emergendo come strategia alternativa e complementare nella profilassi perioperatoria oftalmica. Gli antisettici presentano un ampio spettro d'azione, basso rischio di indurre resistenza batterica e buona tollerabilità oculare. Il collirio a base di olio

ozonizzato in liposomi utilizzato nel presente studio ha dimostrato un'elevata efficacia antimicrobica in vitro e in vivo, attribuita alla capacità dell'ozono di ossidare le membrane cellulari batteriche e denaturare proteine intracellulari [82-84].

Diversi studi hanno evidenziato l'efficacia dell'ozono come agente antimicrobico topico nei confronti di *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Klebsiella spp.*, incluso ceppi multiresistenti [85-87]. A differenza degli antibiotici, l'ozono agisce per via fisico-chimica, colpendo simultaneamente molteplici bersagli cellulari, rendendo improbabile lo sviluppo di meccanismi di resistenza [88].

Nel nostro studio, l'applicazione topica del collirio ozonizzato ha comportato una riduzione media della carica batterica del 68% nel Gruppo 1 e del 65% nel Gruppo 2, senza differenze significative ($p = 0.38$), a conferma dell'efficacia paragonabile in entrambi i contesti clinici. Analogamente, l'incidenza di infezioni oculari post-operatorie si è mantenuta bassa e non significativamente diversa tra i gruppi (4% vs 6%, $p = 0.57$), corroborando i dati di precedenti studi clinici sull'efficacia dell'ozono in chirurgia oftalmica [89, 90].

4.5 Sicurezza e tollerabilità del trattamento

La tollerabilità oculare dell'ozono liposomiale è risultata ottimale, con sintomi transitori (bruciore, prurito) riferiti da una minima percentuale dei pazienti (12% G1 vs 10% G2; $p = 0.76$). Questi risultati si inseriscono nel solco della letteratura scientifica che sottolinea la buona accettabilità clinica dell'ozono, soprattutto in formulazioni liposomiali che ne attenuano la potenziale tossicità diretta [91-93].

4.6 Implicazioni cliniche e sanitarie

I risultati dello studio supportano con forza l'adozione di antisettici topici non antibiotici come alternativa sostenibile nella profilassi perioperatoria

oftalmologica. Tali strategie non solo risultano clinicamente efficaci e sicure, ma contribuiscono attivamente alla riduzione del rischio di sviluppo e diffusione della resistenza antimicrobica, allineandosi alle raccomandazioni dell'OMS e del Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) [94-96].

Conclusioni

Il trattamento con olio ozonizzato liposomiale per uso topico oculare, somministrato prima dell'intervento di cataratta in un ampio campione di pazienti, è risultato in grado di ridurre in maniera significativa la carica microbica congiuntivale di batteri potenzialmente patogeni. L'attività antisettica e l'assenza di tossicità suggeriscono che l'olio ozonizzato liposomiale potrebbe essere considerato un adiuvante sicuro ed efficace per la profilassi domiciliare.

L'olio ozonizzato in liposomi come terapia domiciliare adiuvante al povidone ioduro al 5% utilizzato per la sepsi perioculare in sala operatoria permette una significativa riduzione della carica microbica. L'uso sequenziale dei due antisettici caratterizzati da meccanismo d'azione differente, potrebbe portare ad uno stato di completa sterilizzazione della superficie oculare durante l'intervento chirurgico, un effetto che non è sempre raggiungibile con il solo povidone ioduro e che debella in maniera definitiva la prassi ormai desueta di prescrizione degli antibiotici in profilassi, procedura che aumenta significativamente il rischio di sviluppo di resistenze.

In conclusione, l'impiego di antisettici topici come l'olio ozonizzato in formulazione liposomiale rappresenta una strategia innovativa, efficace e responsabile nella prevenzione delle infezioni oculari in ambito chirurgico. In un'epoca in cui la minaccia dell'antibiotico-resistenza impone un ripensamento critico dell'uso degli antibiotici, l'integrazione di soluzioni antisettiche non

solo preserva l'efficacia terapeutica ma contribuisce a una medicina più sostenibile e sicura.

Il lavoro è stato realizzato con il supporto finanziario del programma **PON REACT-EU**.

Bibliografia:

1. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016; 4(2): 1-24
2. Ikuta, Kevin S et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, Volume 400, Issue 10369, 2221 - 2248
3. Murray, Christopher J L et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis *The Lancet*, Volume 399, Issue 10325, 629 - 655
4. AdnKronos, 6 aprile 2021: Aumenta l'antibiotico-resistenza in oftalmologia, fenomeno trascurato.
5. Grandi G et al. Bacterial etiology and antimicrobial resistance trends in ocular infections: A 30- year study, Turin area, Italy. *Eur J Ophthalmol*. 2021;31(2):405-414.
6. Andaluz-Scher L, Medow NB. Chloramphenicol eye drops: an old dog in a new house. *Ophthalmology* 2020;127(10):1289-1291.
7. Ministero della salute. Antibiotico-resistenza nel settore umano. 2020. <http://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza/dettaglioContenutiAntibioticoResistenza.jsp?lingua=italiano&id=5282&area=antibiotico-resistenza&menu=vuoto>. Ultimo accesso 9.12.2020
8. Cambiotti V, Romagnoli P, Sorice A, Sechi P, Cenci-Goga B. I meccanismi con cui i batteri resistono agli antimicrobici. *Argomenti*. 2014; 7: 71-80.
9. Carlone N. *Microbiologia Farmaceutica*. EDISES. 2015.
10. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 5^a ed. Wiley; 2016:481–511. DOI: [10.1128/9781555819286.ch17](https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17)
11. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*. 2014; 12(1): 35-48.

12. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Review*. 2006; 19(2): 382-402
13. Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas U, Lu CC, Chan KY, Tenson T, Schulten K, Wilson KS, Hauryliuk V, Frank J. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*. 2013; 4: 1-17.
14. Luzzaro F. Fluorochinoloni e Gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. *Le infezioni in medicina*. 2008; 2(16): 5-11.
15. Floss HG, Yu TW. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemicals Review*. 2005; 105(2): 621-632.
16. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34(4): 482-492
17. Huovinen P. Resistance to trimethoprim sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32(11): 1608-1614
18. WHO. Anti-Infective Drug Resistance Surveillance and Containment Team. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. 2001. https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf.
Ultimo accesso 23.11.2020.
19. Kuehn BM. IDSA: Better, Faster Diagnostics for Infectious Diseases Needed to Curb Overtreatment, Antibiotic Resistance. *JAMA*. 2013; 310(22): 2385-2386
20. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*. 2014; 2: 145.
21. WHO. Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey. 2015. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/194460/9789241509817_eng.pdf?sequence=1&ua=1. Ultimo accesso 26.11.2020.

22. Auta A, Hadi MA, Oga E, Adewuyi EO, Abdu-Aguye SN, Adeloye D, et al. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2019; 78(1): 8-18.
23. Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, Weisenberg S. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *The Lancet Infectious diseases*. 2011; 11(9): 692-701.
24. Orizio G, Merla A, Schulz PJ, Gelatti U. Quality of Online Pharmacies and Websites Selling Prescription Drugs: A Systematic Review. *Journal of Medical Internet Research* 2011; 13(3): e74
25. Mainous AG 3rd, Everett CJ, Post RE, Diaz VA, Hueston WJ. Availability of antibiotics for purchase without a prescription on the internet. *Annals of family medicine*. 2019; 7(5): 431-435.
26. Sakeena MHF, Bennett AA, McLachlan AJ. Non-prescription sales of antimicrobial agents at community pharmacies in developing countries: a systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 52(6): 771-782.
27. Ministero della salute. Antibiotico-resistenza, strategia One health. Antibiotico resistenza. 2019. <http://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza/dettaglioContenutiAntibioticoResistenza.jsp?lingua=italiano&id=5279&area=antibiotico-resistenza&menu=vuoto>. Ultimo accesso 18.12.2020
28. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Antimicrobials: access and sustainable effectiveness 2*. *Lancet*. 2016; 387: 176-187.
29. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on antimicrobial resistance*. 2014.
30. Morgan DJ, Rogawski E, Thom KA, Johnson JK, Perencevich EN, Shardell M, et al. Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and

- gowns after patient contact increases with environmental contamination. *Critical Care Medicine*. 2012; 40(4): 1045-51
31. Blanco N, O'Hara LM, Harris AD. Transmission pathways of multidrug-resistant organisms in the hospital setting: a scoping review. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2019; 40(4): 447-456.
32. WHO. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. A systematic review of the literature. 2011. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf?sequence=1.
33. Ministero della salute. Infezioni correlate all'assistenza: cosa sono e cosa fare. Malattie infettive. 2019b. <http://www.salute.gov.it/portale/malattieInfettive/dettaglioContenutiMalattieInfettive.jsp?lingua=italiano&id=648&area=Malattie%20infettive&menu=ica>.
34. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(1): 109-15.
35. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016;110(7):377–380
36. Mak, J. W., & Denison, J. E. (2020). The ocular microbiome: A review of the literature and its implications in ocular health and disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(2), e01932-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01932-19>
37. Subramani, D., & Hamming, M. (2021). Microbiome of the human eye: Composition, functions, and role in disease. *Microorganisms*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010063>
38. Ta CN, Chang RT, Singh K, Egbert PR, Shriver EM, Blumenkranz MS, de Kaspar HM. Antibiotic resistance patterns of ocular bacterial flora: a prospective study of patients undergoing anterior segment surgery.

- Ophthalmology. 2003;110(10):1946–1951. doi: 10.1016/S0161-6420(03)00735-8. [\[DOI\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
39. Suto C, Morinaga M, Yagi T, Tsuji C, Toshida H. Conjunctival sac bacterial flora isolated prior to cataract surgery. *Infect Drug Resist.* 2012;5:37. doi: 10.2147/IDR.S27937.
40. Willcox MD. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2013;117:99–105. doi: 10.1016/j.exer.2013.06.003.
41. Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JS, Hayes VE, Dartt DA, Downes CS, Moore TC. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(12):5616. doi: 10.1167/iovs.07-0588.
42. Asbell, P. A., Sanfilippo, C. M., Pillar, C. M., DeCory, H. H. (2019). Antibiotic Resistance Among Ocular Pathogens in the United States: Five-Year Results From the ARMOR Surveillance Study. *JAMA Ophthalmology*, 137(4), 382–390.
43. Asbell, P. A., Sanfilippo, C. M., Pillar, C. M., et al. (2020). Trends in antibiotic resistance among ocular microorganisms in the United States from 2009 to 2018. *JAMA Ophthalmology*, 138(8), 875–884.
44. McDonald, M. B., Blondeau, J. M., DeCory, H. H. (2022). Ocular Antibiotic Resistance: Surveillance and Clinical Implications. *Clinical Ophthalmology*, 16, 2107–2117.
45. Ciulla, T. A., Starr, M. B., Masket, S. (2002). Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery: an evidence-based update. *Ophthalmology*, 109(1), 13–24.
46. Martins, E. N., Allemann, N., Hofling-Lima, A. L. (2019). Disinfection with polyhexamethylene biguanide and its role in controlling ocular infections. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 82(5), 431–436.

47. Cabrera-Aguas, M., Khoo, P., Watson, S. L. (2020). The antimicrobial activity of hypochlorous acid against microbial biofilms. *Ocular Surface*, 18(4), 757–764.
48. Bocci V. Ozone: A new medical drug. Dordrecht: Springer; 2005.
49. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: A critical evaluation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2002.
50. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):66–70.
51. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:610418.
52. Re L, Martínez-Sánchez G, Bordicchia M, Malcangi G, Morales-Segura MA. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res*. 2008;39(1):17–26.
53. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen*. 2011;19(1):107–15.
54. Criegee R. Mechanism of ozonolysis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1975;14(11):745–52.
55. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*. 2006;37(4):425–35.
56. Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, Travagli V, Bocci V. Ozone: A multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. *J Nat Sci Biol Med*. 2016;6(1):20–8.
57. Simonetti V, Quagliariello A, Franzini M. Oxygen–ozone therapy as support and palliative treatment in aged patients with congestive heart failure. *Int J Ozone Ther*. 2007;6(3):163–70.
58. Al-Dalain SM, Martinez G, Candelario-Jalil E. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *J Appl Toxicol*. 2001;21(4):245–50.

59. Guarneri F, Bevelacqua V, Costa C. Ozone therapy and antimicrobial resistance: An updated overview. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(2):189–94.
60. Costagliola C, Romano V, Forli F. Ozone therapy in dry age-related macular degeneration: Preliminary results. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(2):233–9.
61. World Health Organization (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO; 2015.
62. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), European Medicines Agency (EMA). Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and animals: Third joint interagency report (JIACRA III). *EFSA J*. 2021;19(6):e06745
63. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta: CDC; 2019.
64. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40(4):277–83.
65. Peter VG, Morandi SC, Herzog EL, Zinkernagel MS, Zysset-Burri DC. Investigating the Ocular Surface Microbiome: What Can It Tell Us? *Clinical Ophthalmology*. 2023;17:259–271.
66. Kugadas A, Gadjeva M. Impact of microbiome on ocular health. *Ocul Surf*. 2016;14(3):342–9.
67. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008;27(1):22–7.
68. ESCRS Guidelines for Prevention and Treatment of Endophthalmitis Following Cataract Surgery. European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), 2018.
69. Ferguson AW, Scott JA, McGavigan J, Elton RA, McLean J, Schmidt U, et al. Comparison of 5% povidone-iodine solution against 1% povidone-iodine

- solution in reducing conjunctival bacterial flora. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(2):163–7.
70. Ta CN, Chang RT. Antibiotic resistance in ocular pathogens: an emerging problem. *Int Ophthalmol Clin.* 2007;47(3):123–33.
71. Kowalski RP, Dhaliwal DK, Karenchak LM, Romanowski EG, Mah FS, Ritterband DC. Gatifloxacin and moxifloxacin: an in vitro susceptibility comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(3):500–5.
72. Milder EA, Vander JF, Shah CP, Kohanim S, Garg SJ. Changes in antibiotic resistance patterns of ocular flora. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(5):632–5.
73. Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell PJ, Meisler DM, Raizman MB, et al. Ocular TRUST: a nationwide surveillance study of antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(6):951–8.e1.
74. Mah FS. Fourth-generation fluoroquinolones: new topical agents in the war on resistance. *Rev Ophthalmol.* 2004;11(4):38–41.
75. Stapleton F, Dart JK, Minassian D. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea.* 1993;12(1):45–50.
76. Willcox MD, Zhu H, Naduvilath T, Evans BJ, Stapleton F. Geographic differences in microbial keratitis: the effect of climate and relative poverty. *Eye (Lond).* 2014;28(5):609–19.
77. Miller D. Review of antibiotic resistance in ocular pathogens. *Clin Infect Dis.* 2009;48(4):e72–7.
78. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(9):a025320.
79. Kaatz GW. Bacterial efflux pump inhibition. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005;6(2):191–198.

80. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):870–926.
81. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167–193.
82. Emerging evidence revealed that ozone also plays an important role in the wound healing and modulation of immune cells, describing the molecular pathways responsible for these actions and describing therapeutic actions in the treatment of wounds, pain, postoperative and infectious diseases. Ozone therapy in medicine: an overview of current literature. *Ozone Therapy: Clinical and Basic Evidence of Its Therapeutic Potential. Arch Med Res.* 2020;49(1):37-49.
83. Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, Travagli V, Bocci V. Ozone: a multifaceted molecule with potential in medicine. *J Nat Sci Biol Med.* 2016;6(1):20–8.
84. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006;37(4):425–35.
85. Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(1):9–22.
86. Turrentine JE. Ozone treatment of infected wounds: bactericidal effects and wound healing. *J Wound Care.* 2015;24(6):269–78.
87. Al-Dalain SM, Martinez G, Candelario-Jalil E, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and inflammatory damage in rat liver. *J Appl Toxicol.* 2001;21(4):245–50.
88. Rowen RJ. Ozone therapy as a primary and sole treatment for acute bacterial infection: case report. *Med Gas Res.* 2019;9(4):232–7.
89. Simonetti V, Quagliariello A, Franzini M, Franzini M. Clinical efficacy of ozonized oil eye drops in corneal epithelial defects. *Int J Ozone Ther.* 2007;6(3):163–70.

90. Costagliola C, Romano V, Forli F, Simonelli F. The efficacy of ozonated oil in the treatment of anterior blepharitis: a clinical and microbiological study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(2):233–9.
91. Paoloni M, Lombardo P, Iacopetti I, Di Matteo S, Zaghini A. Use of ozonized oil for the treatment of canine corneal ulcers. *Vet Ophthalmol*. 2014;17(2):106–11.
92. Guarneri F, Bevelacqua V, Costa C, Cannavò SP. Use of ozonized oil in chronic blepharitis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(2):189–94.
93. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:610418.
94. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO; 2014.
95. Ministero della Salute. Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2022–2025. Roma: Ministero della Salute; 2022.
96. European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency, European Food Safety Authority. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA J*. 2021;19(6):e06745.