



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Utilizzo delle tecniche di PFGE e ERIC-PCR per valutare  
la variabilità genomica di *Enterobacter  
cloacae complex***

**Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis,  
Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus  
Typing to assess genomic variability  
among *Enterobacter cloacae complex***

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Marina Mingoia

Correlatore:

Dott.ssa Gloria Magi

Tesi di Laurea di:

Mesturini Viola

Anno Accademico 2025-2026

## INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Tecniche di tipizzazione .....	2
1.2. Polymerase chain reaction (PCR e PCR MULTIPLEX).....	4
1.3. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR .....	6
1.4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) .....	8
1.5. Multi Locus Sequence Typing (MLST) .....	11
1.6. Scopo della ricerca.....	13
2. MATERIALI E METODI.....	15
2.1. Ceppi batterici.....	15
2.2. Estrazione DNA totale .....	16
2.2.1. Qubit4.....	17
2.2.2. Elettroforesi su gel di agarosio .....	19
2.3. Saggi di amplificazione .....	22
2.4. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) .....	25
3. RISULTATI.....	28
3.1. Saggi di amplificazione.....	28
3.2. Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE e S1-PFGE.....	30
3.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	33
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	34
4.1. Conclusioni.....	34
5. BIBLIOGRAFIA .....	37

## 1. INTRODUZIONE

Le tecniche molecolari rappresentano oggi strumenti fondamentali nello studio dell'epidemiologia delle infezioni, offrendo un approccio integrato e significativamente più avanzato rispetto ai metodi tradizionali.

Tali metodologie consentono una caratterizzazione estremamente precisa dei microrganismi patogeni, permettendo di determinare i livelli di clonalità e di garantire un'efficace tracciabilità degli isolati microbici (1, 2).

L'identificazione e la tipizzazione dei patogeni a livello di specie costituiscono elementi essenziali per la diagnosi clinica, la scelta terapeutica e la sorveglianza epidemiologica.

Questo aspetto assume particolare rilevanza nel contesto delle infezioni sostenute da batteri antibiotico-resistenti, nonché nei casi di infezioni nosocomiali ed eventi epidemici o pandemici.

Le metodologie impiegate per la tipizzazione dei microrganismi si distinguono principalmente in due categorie: fenotipizzazione e genotipizzazione.

La fenotipizzazione si basa sull'analisi delle caratteristiche osservabili del microrganismo, quali la morfologia delle colonie, i profili biochimici e sierologici, nonché i fattori di virulenza, patogenicità e resistenza agli antibiotici.

La genotipizzazione, invece, si fonda sull'analisi diretta del genoma microbico, considerando la stretta correlazione tra caratteristiche fenotipiche e variabilità genetica.

È ampiamente riconosciuto che all'interno di popolazioni patogene appartenenti alla stessa specie possa esistere una marcata eterogeneità genetica.

Tale variabilità si manifesta attraverso la presenza di sottopopolazioni costituite da microrganismi geneticamente omogenei definiti "cloni", risultato di mutazioni spontanee e fenomeni di trasferimento genico orizzontale.

I patogeni geneticamente correlati condividono caratteristiche fenotipiche e genotipiche simili, che possono essere utilizzate come marcatori epidemiologici per discriminare tra ceppi patogeni mediante specifiche metodiche di tipizzazione.

L'impiego di tali strumenti fornisce informazioni fondamentali per comprendere la dinamica di diffusione delle infezioni e per definire strategie di prevenzione e controllo mirate (1,2).

### 1.1. *Tecniche di tipizzazione*

La tipizzazione molecolare può essere effettuata attraverso l'utilizzo di vari metodi molecolari che differiscono fra loro per il meccanismo di funzionamento. Essi vengono suddivisi in metodi basati su: a) amplificazione genica, b) restrizione enzimatica, c) sequenziamento.

Metodo	Criteri di "performance"				Criteri di "convenienza"			
	Stabilità	Tipizzabilità	Potere discriminante	Riproducibilità	Facilità di esecuzione	Facilità di interpretazione	Tempo per i risultati <sup>4</sup>	Costo
Analisi plasmidica	variabile	variabile	variabile	buona	moderata	facile	breve	basso
RFLP	buona	eccellente	variabile	eccellente	facile	variabile*	variabile	basso
Ribotipizzazione	buona	eccellente	buono	eccellente	facile	facile	variabile	variabile <sup>5</sup>
PFGE	buona	eccellente	eccellente	eccellente	laboriosa	moderata	medio/lungo	alto
RAPD-PCR e AP-PCR	bassa	buona	buono	bassa	facile	moderata	breve	basso
rep-PCR	moderata	buona	buono	moderata	facile	facile	breve	basso
HRM	buona	eccellente	alto	buona	moderata	moderata	breve	alto
AFLP	buona	eccellente	alto	buona	moderata	facile	medio	basso
Sequenziamento genico	buona	eccellente	eccellente	eccellente	facile	moderata	medio	moderato
MLST	buona	buona	variabile <sup>6</sup>	buona	moderata	moderata	lungo	alto
VNRT-MLVA	buona	buona	eccellente	eccellente	facile	moderata	breve	moderato
SNPs	buona	eccellente	buono	buona	facile	moderata	medio	moderato

**Tabella 1.** *Principali caratteristiche dei vari metodi di tipizzazione molecolare (3)*

La tabella propone un confronto tra le principali metodiche di tipizzazione molecolare impiegate nell'epidemiologia delle infezioni, valutandole secondo due macrocategorie di parametri: criteri di performance e criteri di convenienza. Tale distinzione consente di analizzare sia l'affidabilità scientifica delle tecniche sia la loro applicabilità pratica nel contesto clinico e laboratoristico. I **criteri di performance** descrivono la **solidità metodologica** e la **capacità discriminante** delle tecniche di tipizzazione. La **stabilità** si riferisce alla capacità del marcatore genetico analizzato di mantenersi invariato nel tempo e durante la trasmissione del microrganismo. In particolare, un'elevata stabilità risulta particolarmente importante

negli studi epidemiologici a lungo termine. La **tipizzabilità** indica la percentuale di ceppi effettivamente analizzabili mediante una determinata metodica; un valore elevato garantisce una maggiore applicabilità del metodo nei diversi contesti epidemiologici. Il **potere discriminante** esprime la capacità del metodo di distinguere tra ceppi geneticamente correlati e non correlati, rappresentando uno dei parametri più rilevanti nelle indagini di outbreak (1,2).

La **riproducibilità** valuta la possibilità di ottenere risultati sovrapponibili ripetendo l'analisi nello stesso laboratorio o in laboratori differenti. Questo parametro assume particolare importanza negli studi multicentrici e nei programmi di sorveglianza su larga scala (1).

Complessivamente, una metodica caratterizzata da elevata stabilità, alto potere discriminante e ottima riproducibilità può essere considerata ad alta performance per la sorveglianza epidemiologica (1,2).

I **criteri di convenienza** prendono in considerazione l'aspetto operativo delle tecniche di tipizzazione (1). La **facilità di esecuzione** valuta la complessità tecnica, la necessità di strumentazione avanzata e il livello di competenza richiesto al personale. La **facilità di interpretazione** riguarda la semplicità nell'analisi e nel confronto dei risultati ottenuti. Il parametro **tempo** indica l'intervallo richiesto per ottenere i risultati e rappresenta un parametro cruciale, soprattutto nelle infezioni nosocomiali o in situazioni epidemiche in cui è necessario intervenire tempestivamente. Il **costo** comprende reagenti, strumentazione, manutenzione e risorse umane coinvolte.

Nel complesso, una metodica può presentare eccellenti caratteristiche di performance ma risultare poco conveniente dal punto di vista pratico, ad esempio perché costosa o laboriosa. Viceversa, tecniche semplici e rapide potrebbero non soddisfare il potere discriminante richiesto.

La performance attesa di una metodica dipende strettamente dall'obiettivo dello studio epidemiologico. Nella sorveglianza a lungo termine sono prioritari stabilità e riproducibilità mentre nelle indagini in corso di un *outbreak* è essenziale un elevato potere discriminante. Nella diagnostica rapida assume maggiore rilevanza il tempo di

risposta, ed infine nelle procedure di screening di routine risultano fondamentali basso costo e semplicità di esecuzione. Pertanto, non esiste un metodo universalmente migliore, ma è importante scegliere quello più appropriato in relazione al contesto epidemiologico e alle finalità dell'indagine (1,2). Un esempio applicativo è la tecnica *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) che per molti anni è stata considerata il “gold standard” nella tipizzazione molecolare batterica. Dal punto di vista della **performance**, la metodica presenta buona stabilità, eccellente tipizzabilità, elevato potere discriminante e alta riproducibilità, caratteristiche che rendono questa procedura particolarmente indicata nelle indagini di focolai epidemici ospedalieri, in cui è necessario stabilire se più pazienti siano stati infettati dallo stesso clone batterico. Dal punto di vista della **convenienza**, la PFGE è una tecnica laboriosa che richiede personale esperto, tempi di esecuzione medio-lunghi e costi relativamente elevati. Pertanto, pur rappresentando uno strumento altamente performante, il suo impiego deve essere valutato in funzione delle risorse disponibili e dell'urgenza clinica (1,2).

#### A) Metodi basati su amplificazione genica

##### **1.2. *Polymerase chain reaction***

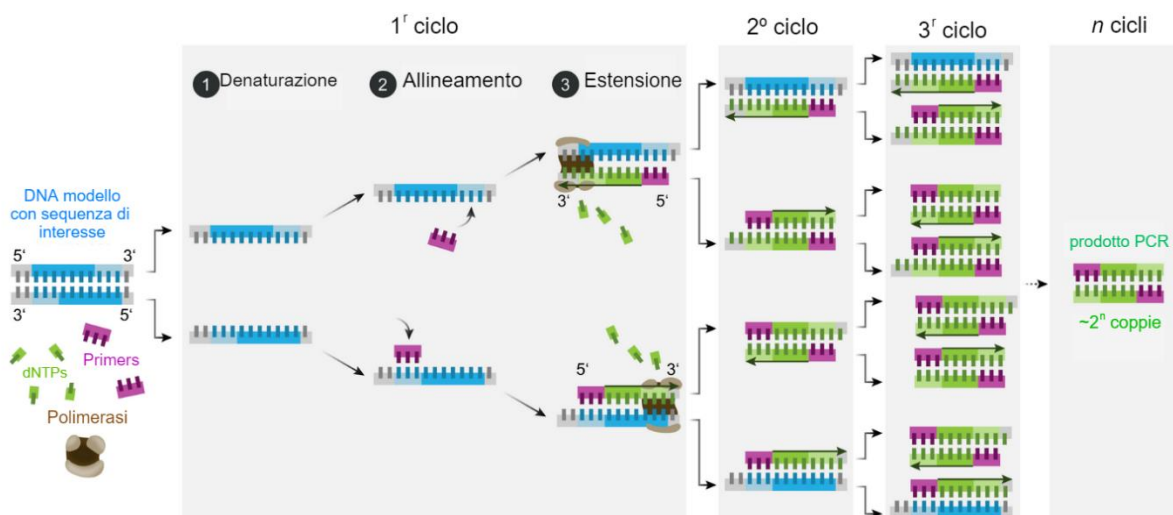
I metodi basati su amplificazione genica costituiscono una delle principali strategie per la tipizzazione molecolare e per la rilevazione rapida di patogeni batterici in laboratorio (4). Tutte queste metodiche, comprese le diverse applicazioni basate su sequenze ripetute (es. ERIC-PCR) fino alle varianti più recenti come la Real-Time PCR, derivano dal principio e dalla procedura originale della *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sviluppata da Kary Mullis negli anni '80.

La PCR consente di ottenere un incremento esponenziale di una specifica sequenza di DNA *in vitro*, rendendo possibile l'analisi anche a partire da piccole quantità di materiale genetico. La procedura prevede tre fasi fondamentali in cui viene modificata la temperatura di reazione ad ogni step, per favorire le reazioni molecolari:

**Denaturazione (90–95°C):** a temperature elevate la doppia elica del DNA viene separata nei due filamenti complementari a singolo filamento;

- **Annealing (40–60°C):** vengono aggiunti dei primers, brevi sequenze oligonucleotidiche, che si appaiano in modo complementare alle sequenze target sul DNA stampo;
- **Estensione (65–72°C):** questa fase prevede l'utilizzo di una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi) che sintetizza nuovi filamenti di DNA utilizzando i primers come sito di innesco, incorporando i nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione.

Questi tre passaggi costituiscono un ciclo che, in una PCR classica, viene ripetuto 30–40 volte, determinando un aumento esponenziale della sequenza bersaglio. L'intero processo viene controllato automaticamente da uno strumento chiamato **thermal cycler**; le condizioni di temperatura in ciascuna fase, il n° dei cicli e i parametri di reazione iniziale e finale possono variare in base al protocollo applicativo (3-4).



**Figura 1.** Illustrazione schema funzionamento PCR.

Negli ultimi anni, alla PCR convenzionale si sono affiancate metodiche più avanzate come la Real-Time PCR, che consente di monitorare in tempo reale l'amplificazione del DNA grazie a sonde fluorescenti (4). La fluorescenza è generata quando la sonda

viene idrolizzata dalla Taq polimerasi durante l'estensione, modificando il rapporto tra la molecola *reporter* e quella *quencher*; la quantità di fluorescenza rilevata è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato, permettendo sia un'analisi quantitativa sia un incremento della sensibilità e dell'affidabilità dei risultati.

Le sonde più utilizzate sono le TaqMan, che presentano la caratteristica di essere idrolizzate dall'attività esonucleasica 5'-3' della Taq polimerasi; il *reporter* ed il *quencher* si trovano sullo stesso oligonucleotide sonda (diverso dalla coppia di primer di amplificazione), per cui la fluorescenza è inizialmente soppressa dal *quencher*. Dopo che la sonda si è legata al filamento di DNA, vicino ai primer, la Taq polimerasi inizia l'estensione dei primer. Durante l'estensione degrada la sonda e separa il *reporter* dal *quencher*. Il *reporter*, non essendo più schermato dal *quencher*, emette fluorescenza, che viene rilevata dallo strumento. Man mano che i cicli di reazione della PCR avanzano, più sonde si legano e sono idrolizzate, portando ad un incremento della fluorescenza (3-4).

La progressione della Real-Time PCR può essere, pertanto, misurata monitorando i cambiamenti dei livelli di fluorescenza, che dipendono dalla quantità di prodotto di PCR accumulato. Se la molecola target è assente, la sonda non è in grado di ibridizzare e non sarà emessa alcuna fluorescenza.

Utilizzando sonde marcate con fluorofori diversi, è possibile rilevare più ampliconi contemporaneamente in un'unica reazione mediante Multiplex Real-Time PCR, senza modificare i principi fondamentali della PCR originale.

### **1.3. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR***

La ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*) è una delle metodiche di amplificazione appartenenti alla categoria delle rep-PCR, che comprendono anche RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*) e AP-PCR (*Arbitrarily Primed-PCR*). Queste tecniche si caratterizzano per l'uso di primers non specifici e per essere condotte a temperature cosiddette a bassa stringenza, con l'obiettivo di amplificare sequenze ripetitive presenti nel genoma batterico (5,6).

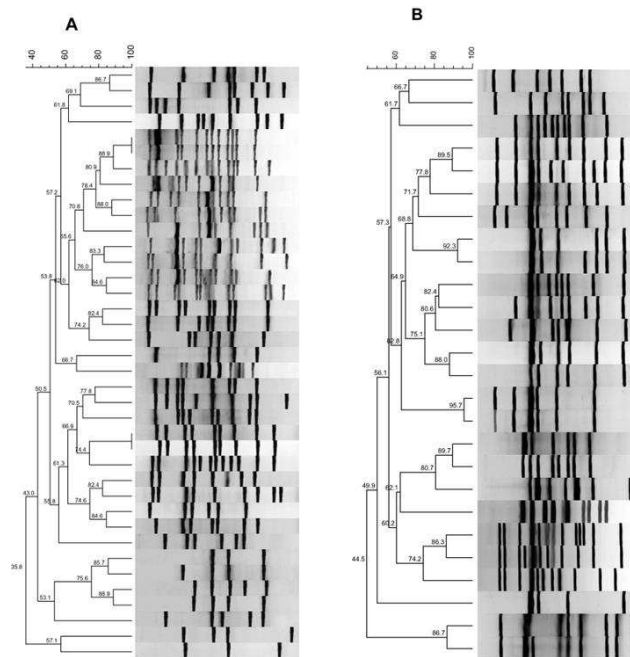
L'ERIC-PCR è stata sviluppata ed utilizzata per mettere in evidenza i polimorfismi nell'ambito dei batteri membri della famiglia *Enterobacteriaceae*, rappresentando uno strumento economico e semplice per la tipizzazione molecolare (7,8). Si basa sull'utilizzo di primer che si associano a sequenze ripetute intergeniche (ERIC consensus 5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') presenti nel genoma degli enterobatteri. Al termine del ciclo di amplificazione, è possibile evidenziare il *fingerprinting* dei campioni, vale a dire per ogni genoma in esame si produce un pattern di bande unico che può essere utilizzato per differenziare ceppi batterici diversi (5,6,7).

Le sequenze ERIC furono identificate per la prima volta da Hulton et al. nel 1991, come una nuova famiglia di elementi ripetitivi nei genomi di *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e altri enterobatteri (6). Come descritto sopra, queste sequenze possono essere marcate con primer che fungono da innesco per la PCR; al termine della procedura di amplificazione si produrranno ampliconi di lunghezza variabile, a seconda della distanza tra due sequenze ERIC adiacenti (6,7).

I prodotti vengono quindi separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, generando un profilo di bande distintivo per ciascun ceppo (5,7,8).

ERIC-PCR è stata ampiamente utilizzata per la tipizzazione di *Escherichia coli*, fornendo informazioni filogenetiche dettagliate sui ceppi e consentendo confronti rapidi tra isolati (8,9). Inoltre, l'analisi dei pattern generati può essere processata mediante algoritmi di calcolo filogenetico come UPGMA per costruire dendrogrammi utili a visualizzare le relazioni genetiche tra ceppi (9).

Anche per i batteri appartenenti al gruppo definito *Enterobacter cloacae complex* diversi studi hanno evidenziato che la tecnica ERIC-PCR consente una tipizzazione degli isolati e una distinzione dei diversi *genovars*. Al contrario, la REP-PCR differenzia meglio a livello di ceppo (7,8).



**Figura 2.** Esempio di applicazione della tecnica ERIC-PCR per la tipizzazione e l'analisi di *E. coli* (A) e *K. pneumoniae* (B). Oltre ai profili di amplificazione è visualizzato il dendrogramma (Source, <https://doi.org/10.2147/IDR.S192597>).

Questa metodologia rappresenta quindi uno strumento importante nella tipizzazione molecolare, nella sorveglianza epidemiologica e negli studi filogenetici dei membri della famiglia *Enterobacteriaceae*, grazie alla sua rapidità, semplicità di esecuzione e basso costo (7,8).

## B) Metodi basati su restrizione enzimatica

### 1.4. *Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*

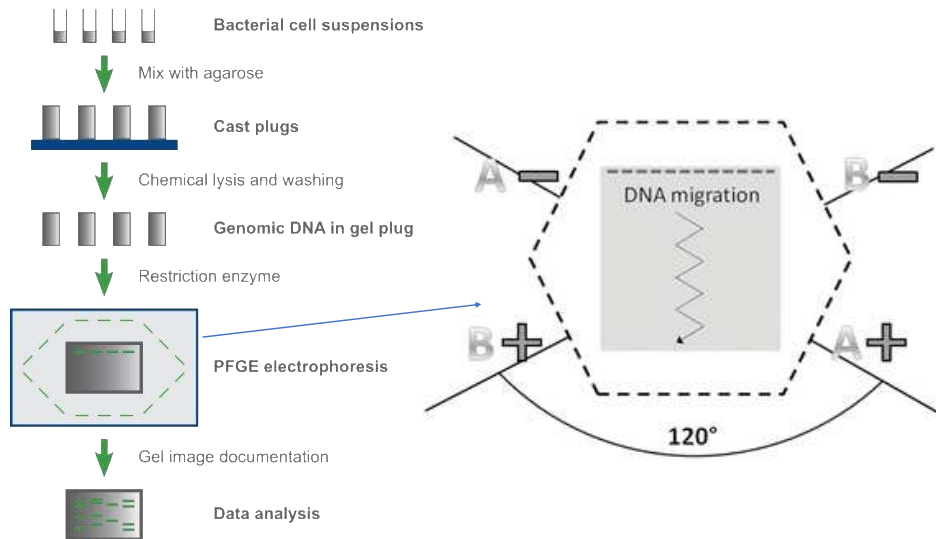
La PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) rappresenta una tecnica di tipizzazione utilizzata in microbiologia per analizzare i pattern di restrizione del DNA cromosomico. La metodica prevede l'inclusione dei microrganismi *in situ* in matrice di agarosio e la successiva digestione del DNA cromosomico con enzimi di restrizione. Il DNA così frammentato viene caricato su un gel e separato mediante l'utilizzo di una camera elettroforetica in grado di cambiare la direzione del campo elettrico secondo tempi predeterminati e con un angolo di 120°. Grazie a questo

campo elettrico pulsato, si possono separare frammenti di DNA di dimensioni maggiori (10–800 kb) rispetto alla classica elettroforesi lineare con una risoluzione elevata. Tenendo fisso l'angolo incluso di 120° (field angle), il campo elettrico varia in funzione dei parametri switch time e ramping factor. La posizione dei frammenti dopo la corsa forma il cosiddetto “Dna fingerprint”, altrimenti indicato come pulstotipo, specifico per ogni campione (10).

Category	No. of genetic differences compared with outbreak strain	Typical no. of fragment differences compared with outbreak pattern	Epidemiologic interpretation
Indistinguishable	0	0	Isolate is part of the outbreak
Closely related	1	2–3	Isolate is probably part of the outbreak
Possibly related	2	4–6	Isolate is possibly part of the outbreak
Different	≥3	≥7	Isolate is not part of the outbreak

**Tabella 2.** Criteri per l'interpretazione dei profili PFGE. (10)

Quando i profili di restrizione non differiscono per nessuna banda si definiscono “indistinguibili”, se differiscono per 2-3 frammenti i ceppi sono considerati “strettamente correlati”, se vi sono 4-6 bande diverse i ceppi sono indicati come “possibilmente correlati”, infine, se i profili differiscono per un numero di bande >7 i ceppi sono considerati “filogeneticamente non correlati”. *cit #11 Foley 2009*



**Figura 3.** *Illustrazione schema funzionamento PFGE. (12)*

Tale metodica, tuttavia, presenta alcuni svantaggi come la laboriosità, il tempo necessario per la conduzione dell'analisi (compresa l'interpretazione dei risultati) e l'utilizzo di apparecchiature relativamente costose. Inoltre, se un "evento" genetico non influenza significativamente la mobilità di un frammento di DNA sottoposto ad elettroforesi, tale cambiamento potrebbe non essere identificato come un pulstipo diverso; per ovviare a tale inconveniente sarebbe opportuno utilizzare enzimi di restrizione differenti al fine di confermare le eventuali relazioni genetiche tra i ceppi. I vantaggi sono, invece, rappresentati dall'elevato potere discriminante e dall'elevata riproducibilità della tecnica per un grande numero di ceppi batterici consentendo, così, di paragonare i dati tra più laboratori; inoltre, il profilo genetico ottenuto non scaturisce dall'analisi di una limitata sequenza target, come si verifica per alcune tecniche di tipizzazione basate su PCR, bensì dall'analisi dell'intero genoma batterico (11,13).

## C) Metodo basato sul sequenziamento

### 1.5. *Multi Locus Sequence Typing (MLST)*

L'MLST è stato uno dei primi metodi di tipizzazione basati sul sequenziamento (14,15). È adatto per indagini a lungo termine, specialmente quando bisogna tipizzare una specie microbica con un alto tasso di ricombinazione genetica. Consiste nell'analisi dei polimorfismi presenti in geni "housekeeping" che codificano per enzimi che catalizzano importanti funzioni metaboliche. I geni da sequenziare per l'analisi sono selezionati in funzione della loro posizione nel genoma, della possibilità di disegnare primers adatti per la loro amplificazione e per evidenziare la diversità tra le sequenze (15,16).

Un aspetto importante dell'MLST è rappresentato dalla possibilità di misurare la ricombinazione genetica tra ceppi batterici, caratteristica alla base della dinamicità evolutiva di una popolazione batterica: infatti, il trasferimento di materiale genetico o la comparsa di mutazioni nel *core gene pool* può produrre linee genetiche divergenti che si sono adattate a particolari condizioni ambientali o a specifici ospiti (14,15).

I dati ottenuti con la procedura sono riproducibili e confrontabili e questo ha reso possibile sviluppare a livello mondiale delle banche dati facilmente accessibili *online*, per consentire l'identificazione dei tipi allelici e dei genotipi degli isolati testati (15,16,17). Questi sistemi sono fondamentali per studi evolutivi di popolazione ma si sono rivelati efficaci anche per analisi di focolai epidemici (18,19).

Il database MLST disponibile (MLSTdbNET) è in continuo aggiornamento e consente di ottenere, al termine dell'analisi, una precisa identificazione di un profilo allelico e il confronto con altri isolati (16,17). Inoltre, il database offre la possibilità di accedere, per le varie specie batteriche, agli schemi dei geni da sequenziare, ai primer di amplificazione e sequenziamento, nonché alla procedura standardizzata da utilizzare. Il sito internazionale PubMLST fornisce l'accesso sia al database MLSTdbNET sia ad un database sviluppato di recente, ossia il BIGSDB, che utilizza

un software progettato per memorizzare e analizzare i dati di sequenza di isolati batterici confrontandoli anche con dati fenotipici (17).

Alcune tecniche di sequenziamento possono essere sfruttate per analizzare altri fattori genetici variabili, quali i geni di virulenza o di antibiotico-resistenza, come la *Sequence-Based Typing* (SBT) (18,19). A differenza della MLST, specificatamente basata sui polimorfismi di geni *housekeeping*, la procedura SBT si focalizza su marcatori diversi e consente di analizzare le differenze alleliche di geni che presentano una variabilità maggiore. Un esempio di questa applicazione in microbiologia è la procedura *spa typing* che consente di analizzare il gene *spa* (codificante la proteina A) di *Staphylococcus aureus*. La tecnica SBT è inoltre ampiamente utilizzata per le indagini sui focolai epidemici causati da *Legionella pneumophila* per distinguere tra ceppi clinici ed ambientali. Lo schema standardizzato di analisi prevede la sequenza di 7 geni *non housekeeping* così da ottenere, in modo analogo alla MLST, un profilo numerico che può essere confrontato con i risultati presenti nel database *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI) (18,19).

#### Prospettive future nella tipizzazione molecolare

Negli ultimi anni, la tipizzazione genomica basata sul sequenziamento dell'intero genoma (WGS, *Whole Genome Sequencing*) sta rapidamente sostituendo molti dei metodi tradizionali come PFGE, MLST o SBT, grazie alla sua capacità di fornire dati ad altissima risoluzione e di identificare contemporaneamente resistenze antibiotiche, fattori di virulenza e variabilità genica (14).

Studi recenti evidenziano come l'approccio genomico rappresenti un grande passo avanti nella sorveglianza epidemiologica e nella caratterizzazione dei ceppi batterici, permettendo di tracciare la trasmissione delle infezioni e di analizzare la popolazione microbica con un dettaglio impossibile da ottenere con i metodi classici (14).

Anche se procedure come MLST o PFGE continueranno ad avere un ruolo in laboratori con risorse limitate o per confronti storici tra studi, la direzione futura degli studi molecolari si orienta sempre più verso la tipizzazione basata sul

sequenziamento, con strumenti bioinformatici in grado di gestire grandi dataset genomici e di rendere i risultati comparabili a livello globale (21).

### **1.6. Scopo della ricerca**

Nell'ambito del gruppo di priorità critica (WHO, 2017) particolare importanza rivestono i batteri della famiglia *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi, antibiotici  $\beta$ -lattamici di ultima generazione, che rappresentano un importante problema medico sanitario a livello mondiale. Le infezioni sostenute da questi batteri, infatti, sono difficili da trattare e sono associate a prolungata ospedalizzazione ed elevati tassi di mortalità. Sebbene la famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprenda circa 50 generi riconosciuti, la sorveglianza per i CP-CRE è solitamente rivolta agli organismi responsabili delle infezioni in ambito nosocomiale, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, seguita da *Escherichia coli* e da specie appartenenti al genere *Enterobacter* (22). La resistenza ai carbapenemi è principalmente associata alla produzione di enzimi  $\beta$ -lattamasi (carbapenemasi), codificati da uno o più geni *bla* presenti a livello plasmidico o cromosomiale, che possono essere espressi in modo inducibile o costitutivo. Ad oggi, sono note oltre 2000  $\beta$ -lattamasi, diffuse in tutto il mondo, differenziabili per diversi aspetti (attività enzimatica, profilo di inibizione, sito attivo, classe molecolare), ma che condividono la capacità di idrolizzare l'anello  $\beta$ -lattamico, il core molecolare degli antibiotici  $\beta$ -lattamici (23). Anche le maggiori carbapenemasi note finora e diffuse nel mondo sono usualmente distinte in base al sito attivo in metallo- $\beta$ -lattamasi (Classe B: IMP, VIM, NDM) e serina- $\beta$ -lattamasi (Classe A: KPC; Classe D: OXA-48). L'enzima VIM-1, fu identificato la prima volta nel 1999 in un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* (24) caratterizzato da specificità di substrato molto ampia in diverse specie della famiglia *Enterobacteriaceae*, in particolare *K. pneumoniae*, *E. coli* e i membri dell'*Enterobacter cloacae complex* (ECC).

La progressiva diffusione dei determinanti genetici VIM all'interno di queste specie ha favorito l'emergere di episodi epidemici in ambito ospedaliero, con particolare coinvolgimento alle specie appartenenti al gruppo *Enterobacter cloacae complex*

(ECC), microrganismi caratterizzati da elevata capacità di adattamento e acquisizione di resistenze antimicrobiche (25).

Questo studio ha lo scopo di caratterizzare una collezione di ceppi ECC multiresistenti, raccolti tra il 2019 e 2023 da campioni clinici di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedali Riuniti di Ancona che sono stati analizzati in dettaglio per questo studio.

La caratterizzazione dei ceppi è stata effettuata mediante diverse procedure di tipizzazione molecolare, tra cui:

- PCR a singolo target e PCR multiplex per la ricerca dei geni di resistenza a carbapenemi ed altri antibiotici;
- ERIC-PCR per l'analisi e il confronto delle sequenze ripetute intergeniche;
- Digestione enzimatica con XbaI e S1 seguita da PFGE per l'analisi rispettivamente dei profili genomici e plasmidici;
- Indagine MLST per lo studio delle relazioni filogenetiche tra i ceppi.

L'obiettivo dello studio è analizzare la relazione filogenetica tra i ceppi MDR in esame e valutare al contempo la capacità discriminante di diversi metodi di tipizzazione.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. *Ceppi batterici*

Sono stati analizzati 14 ceppi appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*, provenienti dall’Azienda Ospedaliera “Ospedali Riuniti” di Ancona, isolati da diversi materiali clinici dal 2019 ad agosto del 2023. Tutti i ceppi sono stati identificati come appartenenti al gruppo *Enterobacter Cloacae Complex* (ECC) che include le specie *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* ed *E. nimipressuralis*.

Specie/N°	ID ceppo	Materiale clinico	Reparto	Anno di isolamento
ECC 1	526797	Urine	Oncologia	2019
ECC 2	534096	Bile	Oncologia	2019
ECC 3	554180\3	Urine	Nefrologia	2019
ECC 4	557644	Sangue	Emodialisi	2019
ECC 5	569195\2	Sangue	Chirurgia	2019
ECC 6	611084	Sangue	Gastroenterologia	2020
ECC 7	665167	Sangue	Pronto Soccorso	2021
ECC 8	693563	Urine	Nefrodialisi	2021
ECC 9	695812/2	Urine da catetere	Neurochirurgia	2021
ECC 10	748301	Sangue	Emodialisi	2022
ECC 11	766462	Urine	Nefrologia	2022
ECC 12	770821	Urine	Nefrologia	2022
ECC 13	823789	Urine	Nefrologia	2023
ECC 14	825795	Tampone rettale	Clinica malattie infettive	2023

**Tabella 3.** *Ceppi batterici analizzati nello studio.*

## 2.2. Estrazione DNA totale

Per l'estrazione del DNA genomico dei batteri è stato usato il Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich), il protocollo intero è consultabile presso il seguente link: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/protocol/genomics/dna-and-rna-purification/genelute-bacterial-genomic-dna-kit>.

Dopo crescita dei campioni batterici *overnight* a 37 °C, in modo tale da avere una coltura fresca, la procedura di estrazione si svolge nelle seguenti fasi operative:

1. In una eppendorf da 2 ml mettere 1,5 ml di soluzione fisiologica in cui stemperare, utilizzando un tampone sterile, le colonie prelevate dalla coltura e aggiustare la torbidità secondo protocollo.
2. Centrifugare 2 minuti a 12000 giri, e al termine scartare il surnatante;
3. Aggiungere al pellet 180 µl di Lysis solution T e risospendere accuratamente;
4. Unire 20 µl di soluzione RNasi per rimuovere l'RNA;
5. Incubare 2 minuti a temperatura ambiente;
6. Aggiungere 20 µl di proteinasi K per la digestione dei componenti proteici e delle DNasi;
7. Incubare 30 minuti a 55 °C in bagno termostato;
8. Aggiungere 200 µl di Lysis solution C e mescolare per inversione;
9. Incubare 10 minuti a 55 °C;

### PREPARAZIONE DELLA COLONNA:

Mettere la colonna sul collection tube e aggiungere 500µl di Column preparation Solution. Centrifugare 1 minuto a 12.000 giri e rimuovere l'eluato: questo passaggio massimizza il legame della colonna al DNA aumentando la resa.

Si procede con l'estrazione:

1. Aggiungere ai campioni 200µl di etanolo al 95%-100%;
2. Caricare i campioni in colonna;
3. Centrifugare 1 minuto a 6500 giri;

4. Buttare lo scarto e prendere nuovi collection tubes;
5. Aggiungere 500µl di Wash solution 1;
6. Centrifugare 1 minuto a 6500 giri e buttare lo scarto;
7. Usare 500µl di Wash solution concentrate (diluito precedentemente con etanolo);
8. Centrifugare 3 minuti a 12.000 giri per togliere l'etanolo. Al termine della centrifuga rimuovere lo scarto e centrifugare nuovamente per 1 minuto per eliminare qualsiasi traccia di etanolo residuo. Infine, cambiare collection tubes;
9. Mettere 200 µl di Elution solution al centro della colonna;
10. Incubare 5 minuti a temperatura ambiente;
11. Centrifugare 1 minuto a 6500 giri;
12. Ripetere i passaggi di eluizione (9-11) una seconda volta;
13. A seguito dell'eluizione all'interno del collection tube si ottiene il DNA

Dopo averne valutato qualità (tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1%) e quantità (tramite fluorimetria), l'estratto può essere conservato in congelatore a -20 °C in modo da poterlo mantenere per tempi lunghi, oppure a 4 °C nel caso dovesse essere utilizzato entro una settimana.

### **2.2.1. Qubit4**

In seguito all'estrazione del DNA, si determina la quantità di acido nucleico presente nel campione. A tal fine, si utilizza il fluorimetro Qubit 4 (Invitrogen), uno strumento altamente sensibile che consente una rapida quantificazione di acidi nucleici (DNA, RNA) e proteine. La quantificazione mediante Qubit 4 si basa sull'utilizzo di una soluzione di buffer e fluorofori specifici per ciascun tipo di campione (DNA, RNA o proteine). I coloranti vengono assorbiti in pochi minuti e possono essere letti in pochi secondi dai fluorometri Qubit, che interpolano le letture su una curva standard. La curva standard si ottiene processando dei campioni standard a concentrazioni note

forniti dal kit. In particolare, per ogni standard si utilizzano 10  $\mu$ l di DNA e 190  $\mu$ l di Working Solution.

Per quantificare i campioni di DNA appena estratti, si prepara una miscela composta da 2  $\mu$ l di DNA estratto e 198  $\mu$ l di Working Solution. La Working Solution è una soluzione contenente buffer e fluorofori che deve essere conservata in frigorifero. Una volta preparata la miscela, è importante vortexare bene il campione per 2-3 secondi e attendere 2 minuti a temperatura ambiente, permettendo al campione di stabilizzarsi prima di procedere con la lettura.

Per la misurazione sul Qubit 4, si seleziona il programma appropriato (ad esempio, "1X dsDNA HS") in base al tipo di buffer utilizzato, e lo strumento eseguirà la lettura, fornendo la misura della quantità di DNA presente nel campione in ng/ $\mu$ l. Se la concentrazione di DNA nel campione risulta troppo alta per essere letta dallo strumento, è necessario diluire il campione. Dopo la diluizione, la lettura andrà ripetuta, tenendo conto del fattore di diluizione per ottenere la quantità effettiva di DNA. Una corretta quantificazione è essenziale per procedere con tecniche come il sequenziamento. In particolare, per l'uso della tecnologia di sequenziamento Nanopore, è fondamentale avere almeno 200 ng di DNA in di 10  $\mu$ l (20 ng/  $\mu$ l).

Se i campioni non raggiungono questa quantità, non sono utilizzabili per il sequenziamento e dovranno essere riestratti.



Qubit 4 Fluorometer | Thermo Fisher Scientific - IT

### 2.2.2 *Elettroforesi su gel di agarosio*

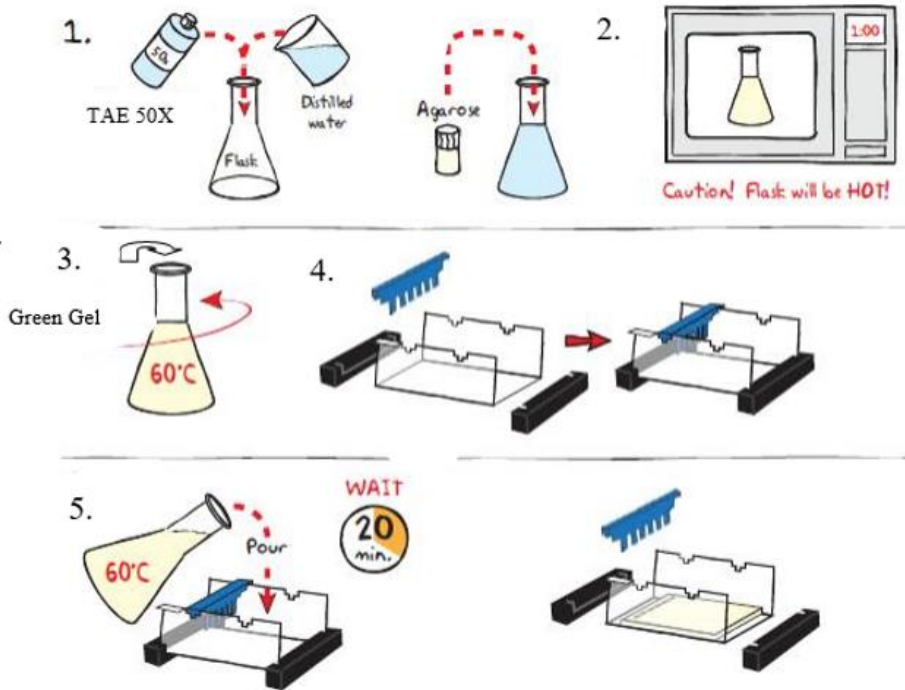
L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica fondamentale per la separazione delle molecole di acido nucleico in base al loro peso molecolare. Sfruttando l'azione di un campo elettrico, le molecole di DNA, che sono cariche negativamente, migrano verso il polo positivo (anodo) ad una velocità inversamente proporzionale alla loro dimensione. La separazione avviene grazie al setaccio molecolare creato dalla matrice di agarosio, che consente di separare i frammenti di DNA in base alla loro grandezza. Al termine della corsa elettroforetica, i frammenti vengono visualizzati tramite l'uso di intercalanti fluorescenti come il Green Gel (Fisher Molecular Biology), che si legano al DNA e lo rendono visibile sotto luce UV.

Per verificare la qualità del DNA estratto, viene eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio, tipicamente al 1%, in una soluzione di TAE (Tris, Acetato ed EDTA) 1X.

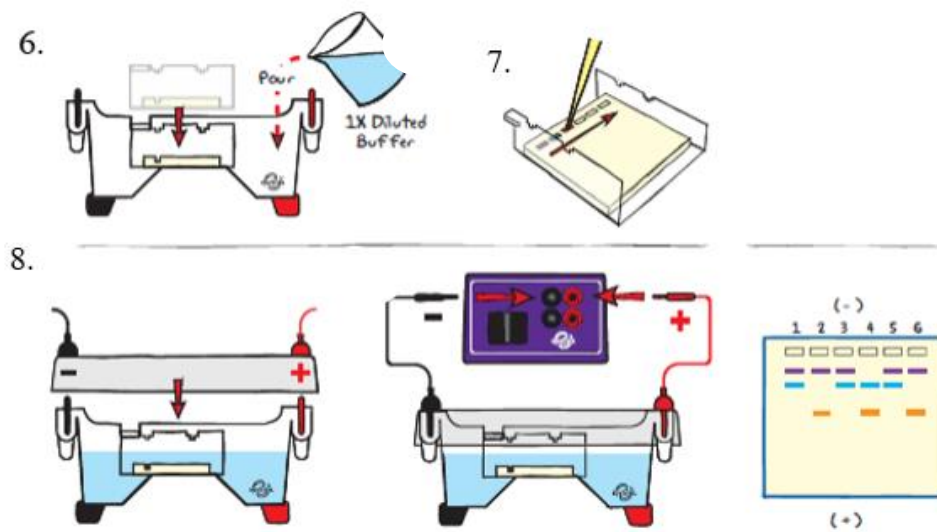
*Fonti: (Agarose D-1 LE Standard for Molecular Biology- Fisher Molecular Biology).* È essenziale che il DNA non sia frammentato, per non compromettere l'efficacia della tecnica di sequenziamento, soprattutto long reads sequencing (Oxford Nanopore), e successivo assemblaggio. La presenza di uno smear, ovvero una traccia continua e diffusa nel gel, indica un DNA degradato e di scarsa qualità. Al contrario, la presenza di bande nette e ben definite suggerisce un campione di buona qualità, con DNA integro e di alto peso molecolare.

La procedura di elettroforesi si svolge come segue:

1. Preparazione della soluzione di agarosio 1% usando TAE mescolando 1g di agarosio ogni 100ml di TAE.
2. Riscaldare la soluzione fino all'ebollizione e lasciare raffreddare a 55°C in un bagno termostatico.
3. Aggiungere il colorante Green Gel sotto la cappa chimica.
4. Montare il supporto per il gel e il pettine per creare i pozzetti
5. Versare la soluzione nel supporto per il gel sotto la cappa chimica e lasciarla solidificare.

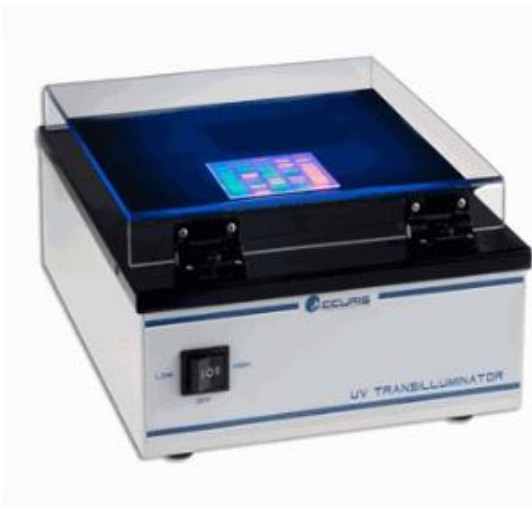


6. Una volta che il gel è completamente solidificato e raffreddato, posizionarlo nella camera elettroforetica, assicurandosi che sia completamente immerso nel tampone TAE.



7. Caricare 10  $\mu$ l del DNA estratto di ciascun campione, miscelato con 2  $\mu$ l di DNA Loading Dye (Trick Track 6X) per facilitare il caricamento del campione e la visualizzazione.
8. Applicare un voltaggio di 90V e avviare la corsa per un tempo variabile tra 30 minuti e un'ora, a seconda dell'altezza delle bande di interesse.

Al termine della corsa, il gel viene visualizzato al transilluminatore UV (*figura 4.*) in camera oscura.



*(Figura 4.)*

La presenza di marker con peso molecolare noto, come il GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific), viene utilizzata per determinare le dimensioni dei frammenti.



### *Elettroforesi e analisi dei profili*

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5 o 2% in tampone TAE 1X. Come standard molecolare è stato utilizzato il Marker 100 bp Plus DNA Ladder (New England Biolabs) che presenta intervallo dimensionale 100–3000 bp. Il risultato è stato visualizzato al transilluminatore UV previa colorazione con intercalante fluorescente GelGreen (Merck Life Science S.r.l.).

### **PCR**

In questo studio, la PCR è stata utilizzata per la ricerca di geni codificanti le principali carbapenemasi (KPC, OXA-48, NDM, IMP e VIM) utilizzando primer e procedure presenti in letteratura (27)(**Tabella 4**); geni codificanti le principali  $\beta$ -lattamasi di classe A (TEM, SHV, OXA) sempre in accordo con la letteratura (28) (**Tabella 4**); geni funzionali e di resistenza degli integroni di classe 1 con primer di letteratura (29) (**Tabella 5**) e di nostra produzione. In tutte le reazioni di amplificazione è stata utilizzato l'enzima DreamTaq (ThermoFisher) e, se il prodotto di amplificazione eccedeva le 3 kb, l'enzima ExTaq (EX Taq Takara). L'elenco completo dei componenti utilizzati con le rispettive concentrazioni e volumi finali è riportato in seguito:

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME FINALE
<i>DNA genomico</i>	Non standardizzata	2 $\mu$ l
<i>Buffer 10X</i>	1X	5 $\mu$ l
<i>Primers</i>	Vedere letteratura di riferimento	Dipende dalla concentrazione richiesta in letteratura
<i>dNTP (10 mM)</i>	200 $\mu$ M	1 $\mu$ l
<i>DreamTaq polymerase</i> <i>5U/<math>\mu</math>l (ThermoFisher</i> <i>Scientific, Waltham, USA)</i>	1U	0,2 $\mu$ l
<i>H<sub>2</sub>O milli-Q sterile e DNAsi</i> <i>free</i>		Per portare al volume finale di 50 $\mu$ l

Gene target	Primer	Sequenza (5' → 3')	Amplicone (bp)	Riferimento
<i>blaIMP</i>	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTC	232	Poirel 2011
	IMP-R	TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC		
<i>blaVIM</i>	VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	390	
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
<i>blaNDM</i>	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621	
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>blaOXA-48</i>	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<i>blaKPC</i>	KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	
	KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		
<i>blaTEM</i>	MultiTSO-TEM_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	
	MultiTSO-TEM_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>blaSHV</i>	MultiTSO-SHV_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713	Dallenne 2010
	MultiTSO-SHV_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<i>blaOXA-1-like</i>	MultiTSO-OXA_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	
	MultiTSO-OXA_rev	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		

**Tabella 4.** Primer di geni di resistenza utilizzati.(27,28)

GENE	PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	DIMENSIONE (bp)
<i>int11</i>	CS-INT2 F	TCTCGGGTAACATCAAGG	
5'-CS	class 1 F	GGCATCCAAGCAGCAAG	
3'-CS	class 1 R	AAGCAGACTTGACCTGA	
<i>sul1</i>	sul1-F	ATGGTGACGGTGTTCGGCA	823bp
	sul1-R	CTCGGTCTCTGGCGTCGC	
<i>aac6-Ib</i>	aac6-Ib-F	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482bp
	aac6-Ib- R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>aadA1</i>	aadA1-F	TCAGAGGTAGTTGGCGTC	752bp
	aadA1-R	TATTTGCCGACTACCTTGGT	
<i>catB2</i>	catB2-F	GCAGGTGAAGAATCCGAAC	548bp
	catB2-R	CAATGCCAGACGAACAAAG	

**Tabella 5.** Primer usati per lo studio dell'integrone classe 1 (29)

## 2.4. *PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)*

Per effettuare la tecnica di tipizzazione PFGE è stato seguito il protocollo di letteratura *Hunter, 2005*; <https://pulsenetinternational.org/protocols/pfge/>), CODE: PN01([www.pulsenetinternational.org](http://www.pulsenetinternational.org))

### PROCEDURA:

#### *Preparazione delle plugs*

1. Dopo incubazione O.N. a 37 °C, stemperare alcune colonie in 2 ml di Suspension buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA pH 8.0, Acqua MilliQ con tampone sterile, standardizzando gli inoculi per ottenere una densità ottica di 0,8 O.D. (range 0,570-0,820) ad una lunghezza d'onda di 610 nm;
2. Aliquotare 400 µl della sospensione batterica e aggiungere pari volume (400 µl) di Low Melt Agarose (Bio-Rad, Hercules); versare nell'apposito stampo ("plug mold");
3. Lasciare raffreddare fino a completa solidificazione

#### *Lisi cellulare*

4. Trasferire le plug in una provetta contenente 5 ml di Lysis buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0 1% Sarcosyl) e 25 µl di proteinasi K (20 µg/ml);
5. Incubare per 2 ore a 54 °C in agitazione in bagno termostato;
6. Eseguire 6 lavaggi totali usando 5ml di soluzione di lavaggio con le seguenti modalità: 2 lavaggi con acqua MilliQ e 4 lavaggi con TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0, acqua, entrambi pre-riscaldati a bagnomaria a 55 °C.
7. Dopo l'ultimo lavaggio, aggiungere 5 ml di TE a temperatura ambiente e conservare a 4°C .

### *Digestione enzimatica*

Per gli scopi di questo studio sono stati utilizzati due enzimi: **XbaI** e **S1**

- **S1** è una nucleasi prodotta da *Aspergillus oryzae* che permette di determinare quanti plasmidi contiene un determinato ceppo batterico, convertendo i plasmidi super avvolti in forme lineari. (30).
- L'enzima di restrizione **Xba-I** tagliando poco frequentemente il DNA dei batteri Gram negativi produce frammenti di grandi dimensioni e viene, quindi, utilizzato per confrontare i profili tra i vari ceppi in esame;

La digestione viene condotta con protocolli diversi per i due enzimi. Per entrambi si preparano una miscela di reazione usando l'enzima (75U di S1 e 40 U di XbaI), il buffer Tango (Thermo Scientific) all'1X e acqua MilliQ per portare a volume (200 µl per campione). Si aggiunge metà plug e si lascia in incubazione per il tempo e la temperatura ottimali per l'enzima (30 minuti a temperatura ambiente per S1 e 2 h a 37°C per XbaI)

8. Al termine dell'incubazione bloccare la digestione aggiungendo 500µl di EDTA (0,1M, pH 8) e lasciando agire per 10 minuti.

### *Preparazione del gel ed elettroforesi*

9. Posizionare i marker e le plugs dei campioni sul pettine, utilizzando una piccola quantità di Low melt Agarose pre-riscaldato. Markers:  
Per Xba I: Lambda ladder (Size range: 48.5-1,018 kb, New England Biolabs)  
Per S1: Mid Range (Size range: 15–291 kb, New England Biolabs)
10. Creare una soluzione di 2300ml di TBE 0,5X (Tris, Borato, EDTA) e acqua milliQ per portare a volume:
11. Prelevare 110ml di TBE 0,5X per preparare il gel all'1% aggiungendo di 1.1g di Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad). Una volta solidificate le plugs sul pettine posizionarlo sul supporto versare il gel. Lasciar solidificare ed estrarre

- il pettine: in questo modo le plugs rimarranno completamente inglobate in posizione e all'interno del gel;
12. Il restante volume di TBE 0,5X viene versato all'interno della camera di corsa elettroforetica come tampone di corsa.
13. Caricare il gel nello strumento Chef Mapper XA System (Biorad) e fare partire la corsa dopo avere impostato i parametri richiesti.

PARAMETRI	Xba I	S1
Run time	22 ore	18 ore
Field Angle	120°	120°
Initial Switch Time	2,2 secondi	0,5 secondi
Final Switch Time	54,2 secondi	20 secondi
Ramping Factor	lineare	lineare
Gradient	6 V/cm	6 V/cm
Temperature	14°C	14°C

La visualizzazione delle bande è effettuata al trans-illuminatore UV dopo aver colorato il gel con Bromuro d'Etidio (0,5 µg/ml) per 30-45 minuti. L'interpretazione dei profili di restrizione avviene seguendo i criteri letteratura riportati in *tabella 2. (10)*

# 1. RISULTATI

## 3.1. Saggi di amplificazione

### PCR E PCR MULTIPLEX

Applicando le procedure di PCR e PCR Multiplex per la ricerca di geni di beta-lattamasi (geni *bla*) ed altri geni conferenti la resistenza a differenti classi di antibiotici sono stati ottenuti i seguenti risultati (*Tabella 6*).

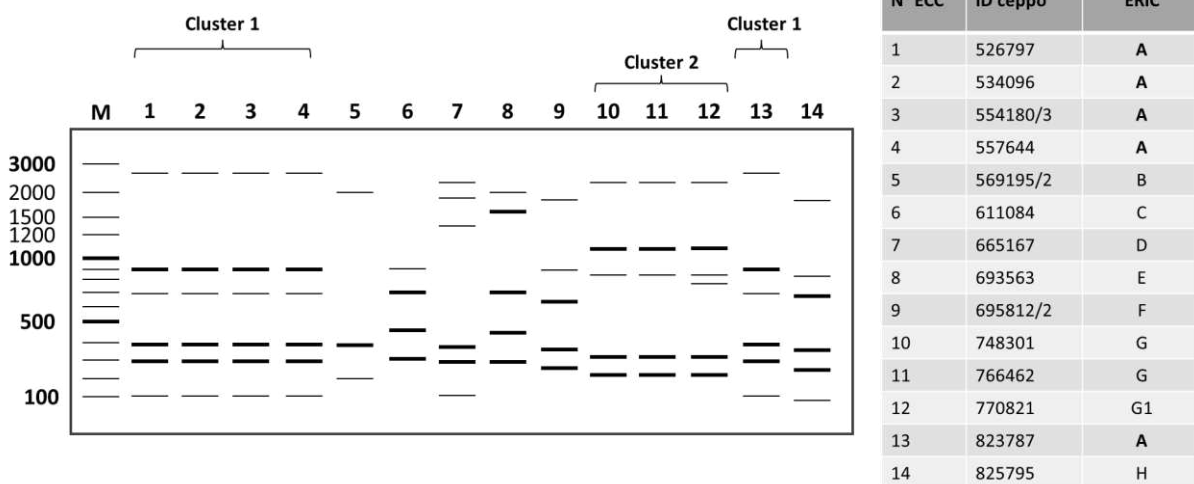
N° ECC	ID Ceppo	Geni di resistenza <i>bla</i> codificanti beta-lattamasi								Altri geni di resistenza			
		TEM	SHV	OXA-1	KPC	VIM	NDM	OXA-48	IMP	<i>aadA1</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>catB2</i>	<i>sul1</i>
ECC1	526797	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC2	534096	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC3	554180/3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC4	557644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECC5	569195/2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC6	611084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECC7	665167	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECC8	693563	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECC9	695812/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECC10	748301	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC11	766462	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC12	770821	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC13	823789	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ECC14	825795	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

**Tabella 6.** Geni di resistenza identificati mediante analisi PCR.

La ricerca dei geni codificanti le principali classi di carbapenemasi (IMP, VIM, KPC, OXA-48 e NDM) ha evidenziato che 9 ceppi ECC erano positivi unicamente per il gene di *blaVIM*. Tutti questi ceppi erano fenotipicamente resistenti ai carbapenemi e multiresistenti. Oltre al gene *blaVIM* diversi ceppi presentavano altri geni di beta-lattamasi, in particolare, 4 ceppi avevano *blaSHV* e 1 isolato (665167) era positivo per *blaOXA-1*. Nessun isolato presentava *blaTEM*. La multiresistenza dei 9 ceppi VIM-positivi era data dalla presenza di altri geni di resistenza quali *aadA1*, *aac(6')-Ib*, *catB2* e *sull1*. In base a queste evidenze di amplificazione e dei dati di letteratura è stata ipotizzata, in tutti i 9 ceppi ECC VIM-produttori, la presenza di un integrone di classe 1 (29,31) quale elemento genetico associato.

### ERIC-PCR

La successiva **Figura 5** riporta i risultati di *fingerprinting* per i 14 ceppi ECC ottenuti con la procedura ERIC-PCR.



**Figura 5.** Risultati di ERIC-PCR dei 14 ceppi ECC e relativo fingerprinting. M, Marker 100 Plus DNA Ladder (New England Biolabs): size, 100-3000 bp. Sono indicati i due cluster principali ottenuti.

L'analisi ha evidenziato in totale 9 profili ERIC-PCR differenti: A, B, C, D, E, F, G, G1 e H e sono riconoscibili due cluster di ceppi identici/correlati (cluster 1 e cluster 2).

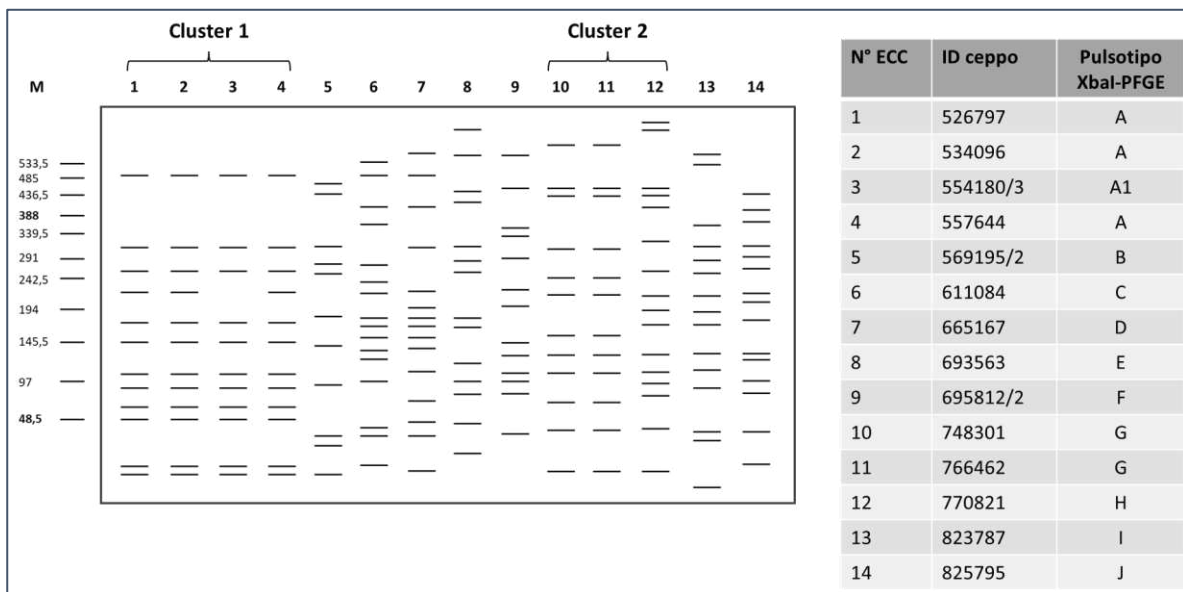
Il cluster principale è rappresentato dal profilo A, che include i ceppi ECC1, ECC2, ECC3, ECC4 e ECC13. È interessante notare che ECC13, pur essendo stato isolato nel 2023, mostra lo stesso profilo ERIC (A) dei ceppi precedenti, suggerendo una possibile persistenza clonale nel tempo.

Un secondo cluster è costituito dai ceppi ECC10 e ECC11, che presentano profilo identico (G), ed un ceppo strettamente correlato (profilo G1) che differisce per una banda aggiuntiva rispetto al profilo G.

Gli altri profili (B, C, D, E, F e H) sono rappresentati da singoli isolati non filogeneticamente correlati con i due cluster e tra loro.

### 3.2. Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE e SI-PFGE

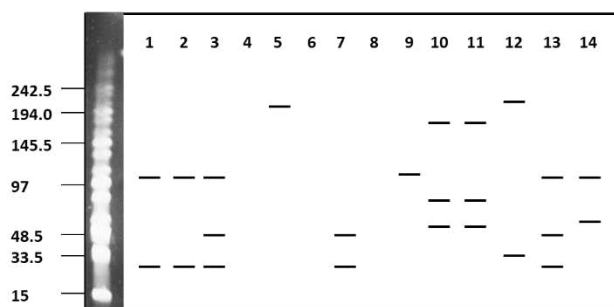
I profili dei ceppi in esame ottenuti mediante l'analisi XbaI-PFGE e la relativa interpretazione sono riportati in **Figura 6**.



**Figura 6.** XbaI-PFGE dei 14 ceppi di *E. cloacae* complex e relativi pulsotipi. M, Lambda PFG Ladder (New England Biolabs). Sono indicati i due cluster identificati mediante le analisi ERIC-PCR.

L'analisi XbaI-PFGE complessivamente ha identificato 11 pulsotipi differenti. Possiamo notare come i primi due ceppi (526797 e 534096) e il quarto (557644) sono indistinguibili tra loro, hanno identico pulsotipo A, e sono strettamente correlati con il terzo (554180/3) che differisce per l'assenza di un frammento XbaI e a cui è stato assegnato il pulsotipo A1. Questi primi 4 genomi erano già stati identificati come parte del cluster 1. È interessante notare che il genoma ECC13 che con la precedente analisi ERIC-PCR era facilmente incluso nel cluster 1, con questa procedura mostra un profilo di bande assai diverso (pulsotipo I) e in base ai criteri standard di interpretazione (10) non sarebbe considerato parte del cluster. Considerando che i primi 4 ceppi del cluster 1 sono stati isolati nel 2019 mentre ECC13 è del 2023, il risultato sembra evidenziare una divergenza genomica avvenuta nel tempo a livello dei siti di restrizione XbaI. Analoga considerazione può essere fatta anche per il secondo cluster. I due ceppi ECC10 (748301) ed ECC11 (766462) sono indistinguibili tra loro, condividendo il pulsotipo G, mentre ECC12, che con l'analisi ERIC-PCR risultava strettamente correlato a ECC10-11, in questa procedura mostra un pulsotipo nettamente distinto. Gli altri ceppi risultano avere pulsotipi differenti non correlati tra loro e con i profili principali.

Per analizzare il contenuto plasmidico è stata utilizzata la tecnica di PFGE previa digestione con l'enzima S1. Le dimensioni molecolari dei plasmidi (kb) sono state stimate in base al marker *Lambda PFG Ladder* (range,  $\approx 48,5 \text{ kb} - \sim 1.000 \text{ kb}$  (1 Mb). I risultati sono presentati in **Figura 7**.



N° ECC	ID ceppo	N°	Size (kb)
1	526797	2	100; 30
2	534096	2	100; 30
3	554180/3	3	100; 50; 30
4	557644	-	-
5	569195/2	1	200
6	611084	-	-
7	665167	2	50; 30
8	693563	-	-
9	695812/2	1	100
10	748301	3	180; 80; 60
11	766462	3	180; 80; 60
12	770821	2	220; 40
13	823787	3	100; 50; 30
14	825795	2	100; 70

**Figura 7.** Risultati in PFGE dopo digestione con *S1*

I 14 ceppi analizzati presentano profili plasmidici differenti, con 3 genomi senza plasmidi evidenti (ECC4,6,8). Tuttavia, all'interno dei cluster 1 e 2 è possibile osservare che alcuni ceppi mantenevano lo stesso pattern plasmidico. Nel cluster 1, i ceppi 1, 2, 3 e 13 presentano un pattern simile, sebbene i ceppi 3 e 13 condividano una banda plasmidica in più. Il ceppo 4, che appartiene al cluster 1 (in base alle indagini ERIC-PCR e *Xba*I-PFGE) in realtà non presenta nessun plasmide. Questo dato conferma i risultati fenotipici, difatti il ceppo ECC4 è sensibile ai carbapenemi ed altri antibiotici e risulta privo di geni di resistenza (*Tabella 6*): la cura plasmidica rappresenta un evento genetico a breve termine che in ECC4 ha causato la perdita dei geni di resistenza associati.

Nuovamente, nel cluster 2 si evidenzia una certa variabilità: i ceppi 10 e 11 condividono lo stesso profilo plasmidico, mentre il ceppo 12 mostra un pattern di bande differente per numero e dimensione molecolare.

### 3.3 *Multi Locus Sequence Typing (MLST)*

Mediante il software online sono state analizzate le sequenze genomiche dei 14 ceppi di *Enterobacter cloacae complex* in esame per ottenere i rispettivi Sequence Types (STs) (Tabella 7).

<b>N° ECC</b>	<b>ST</b>
<b>ECC 1</b>	45
<b>ECC 2</b>	45
<b>ECC 3</b>	45
<b>ECC 4</b>	45
<b>ECC 5</b>	182
<b>ECC6</b>	386
<b>ECC7</b>	114
<b>ECC 8</b>	NT*
<b>ECC 9</b>	106
<b>ECC 10</b>	286
<b>ECC 11</b>	286
<b>ECC 12</b>	286
<b>ECC 13</b>	45
<b>ECC 14</b>	62

**Tabella 7.** MLST dei 14 ceppi di *E. cloacae complex*. \* Per l'unico ceppo non tipizzabile, ECC8, il software MLST Finder non identifica l'allele *pyrG* e fornisce i ST filogeneticamente più vicini: 495,1394,1070,35.

Dalla tabella si può notare che i primi 4 ceppi isolati (526797, 534096, 554180/3, 557644) e il ceppo ECC13 del 2023 (823789) presentano lo stesso Sequence Type 45, mentre (748301, 766462 e 770821) appartengono allo stesso Sequence Type 286. L'analisi MLST pertanto evidenzia due cloni principali ST45 e ST286 nell'ambito della collezione esaminata e suggerisce la circolazione di specifiche linee clonali di ceppi ECC MDR e produttori di carbapenemasi. Gli altri ceppi mostrano ST diversi o non risultano tipizzabili (ECC8) e rappresentano linee genetiche distinte e non correlate tra loro.

## 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 4.1 Conclusioni

L'analisi di PCR e PCR multiplex ha consentito di evidenziare il resistoma e fornire una prima caratterizzazione dei 14 ceppi di *Enterobacter cloacae complex* (ECC), 9 dei quali risultavano produttori di carbapenemasi di tipo VIM (*bla<sub>VIM</sub>*). La dimostrazione in questi ceppi di ulteriori determinanti di resistenza [*aac(6')*-Ib, *aadA1*, *sul1*, *catB2*] suggeriva la presenza di un integrone di classe 1, come descritto in letteratura per specie/ceppi VIM-produttori (28,29). Tale integrone può essere sia a codificazione cromosomica e plasmidica.

L'analisi comparativa delle procedure molecolari condotte per tipizzare i ceppi ECC in esame (ERIC-PCR, XbaI-PFGE, S1-PFGE e MLST) ha permesso di studiarne la variabilità e le relazioni filogenetiche, pur con diversi livelli di discriminazione e risoluzione.

Le tecniche ERIC-PCR e MLST hanno dato risultati sostanzialmente sovrapponibili. L'MLST ha identificato 7 Sequence Type (ST) differenti tra i 14 isolati clinici studiati dimostrando la presenza di due linee genetiche principali:

- ST45 (comprendente i primi 4 ceppi e ECC13)
- ST286 (che comprende i ceppi ECC 10-11-12).

L'ERIC-PCR ha mostrato una distribuzione altamente coerente con l'MLST:

- il cluster ST45 corrisponde al profilo ERIC A;
- il cluster ST286 corrisponde ai profili ERIC G dei ceppi ECC10-11e G1, quest'ultimo assegnato a ECC12 per la presenza di 1 sola banda aggiuntiva.

Complessivamente, entrambe le procedure portano ad un risultato sovrapponibile con una buona capacità discriminativa per l'analisi delle popolazioni batteriche e lo studio della variabilità genetica a medio-lungo termine, evidenziando specifiche linee genetiche (*lineages*).

Anche l'analisi mediante la procedura XbaI-PFGE mette in evidenza la diversità genomica dei ceppi ECC, essendo stati identificati 11 pulsotipi (A-J) sul totale di 14 ceppi. Questa metodica ha una capacità di discriminazione più profonda, in grado di

evidenziare delle differenze anche all'interno dei ceppi appartenenti alle due linee genetiche già individuate. In particolare:

- all'interno del clone ST45, i primi 4 ceppi del 2019 mostravano profili identici (ECC 1, 2 e 4, pulsotipo A) o strettamente correlati (ECC3, pulsotipo A1), mentre il ceppo ECC13 isolato nel 2023 aveva un pulsotipo I distinto;
- analogamente per il ST286, i ceppi ECC10 e 11 erano indistinguibili (identico pulsotipo G), mentre ECC12 avevano un profilo H diverso.

Questi risultati evidenziano come la tecnica PFGE sia utile per studiare le variazioni genetiche a breve termine, rilevando differenze che non emergono con l'indagine MLST e sono lo parzialmente suggerite dall'ERIC-PCR. La maggiore discriminazione si evidenzia nettamente per i ceppi ECC12 ed ECC13, che appaiono identici o strettamente correlati con le analisi MLST ed ERIC, ma differenti in base alla PFGE. Pur considerando che la PFGE è una tecnica laboriosa, con procedure lunghe di esecuzione e che richiede personale altamente specializzato, rimane estremamente valida nel rilevare anche lievi variazioni genomiche, utili nelle indagini epidemiologiche ospedaliere.

La procedura di analisi S1-PFGE consente di evidenziare un ulteriore livello di variabilità genomica, di studiare l'evoluzione (e l'eventuale perdita ed acquisizione in tempi rapidi) di plasmidi, note piattaforme genetiche alla base della diffusione dell'antibiotico-resistenza. In particolare:

- l'assenza di plasmidi del ceppo ECC4, appartenente al cluster 1, giustifica il risultato fenotipico, vale a dire la perdita della resistenza ai carbapenemi (e altri antibiotici) e all'assenza di *bla<sub>VIM</sub>* e altri geni di resistenza che sono tipici di tutti gli altri ceppi del clone ST45.
- Il ceppo ECC12 (cluster 2, ST286) ha un pattern plasmidico diverso per numero e dimensioni.

Questa indagine dimostra come le variazioni a livello di plasmidi rappresentino eventi evolutivi a brevissimo termine, ancora più dinamici rispetto alle modificazioni cromosomiche rilevate dalla PFGE convenzionale. Anche la S1-PFGE, pur

condividendo con la PFGE le stesse difficoltà logistiche (tempi lunghi, complessità tecnica), si è dimostrata fondamentale per studiare la dinamica della perdita/acquisizione dei plasmidi.

Nel complesso:

- le indagini MLST ed ERIC-PCR offrono risultati coerenti tra loro e descrivono efficacemente l'evoluzione clonale a medio-lungo termine;
- XbaI-PFGE permette di evidenziare differenze genetiche a breve-medio termine, rilevando variazioni non sempre intercettate da MLST/ERIC;
- S1-PFGE mostra una variabilità ancora più dinamica, nel brevissimo-breve termine, poiché indaga elementi genetici, quali i plasmidi, che sono sottoposti ad un turnover (perdita/acquisizione) ancor più rapido.

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura (come discusso nell'introduzione), secondo cui:

- le popolazioni di ECC carbapenemasi-produttori risultano altamente eterogenee (25). Tale situazione è diversa da quanto osservato in *K. pneumoniae*, dove la diffusione è spesso sostenuta da pochi cloni predominanti (es. CG258) (31);
- le tecniche basate su macrorestrizione (XbaI-PFGE) presentano maggiore potere discriminante nelle indagini epidemiologiche locali;
- la variabilità plasmidica gioca un ruolo chiave nella diffusione dei determinanti di resistenza e può essere analizzata mediante S1-PFGE.

In conclusione, l'uso di tecniche diverse di tipizzazione molecola ha consentito di caratterizzare una collezione di ceppi ECC, di individuare la diversità dei ceppi MDR VIM-produttori, di individuare dei cloni principali e tracciare la loro evoluzione nel periodo 2019-2023.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Andrei A, Zervos MJ*. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2006;130(5):662–668.
2. *Stefani S, Agodi A*. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000;13(2):143–148.
3. *Sammarco ML, Ripabelli G, Tamburro M*. Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati. *Annali di Igiene*. 2014;26(3):215–227.
4. *Mothershed EA, Whitney AM*. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*. 2006;363(1–2):206–220.
5. *Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR*. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(24):6823–6831.
6. *Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM*. ERIC sequences: a new family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 1991;5(4):825–834.
7. *Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S*. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2012;7(7):887–902.
8. *Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR*. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 1994;5:25–40.
9. *Davis J, Akella S, Waddell P*. Acceleration of phylogenetic computation on the desktop: experiments with running UPGMA in programmable logic. *In: Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEMBS)*. 2004.
10. *Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B*. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(9):2233–2239
11. *Foley SL, Lynne AM, Nayak R*. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009;9(4):430–440.
12. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. *Microbe Online*. 2020. Disponibile su: <https://microbeonline.com/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge/>

13. Foley SL, Zhao S, Walker RD. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2007;4(3):253–276.
14. Didelot X, Maiden MCJ. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*. 2010;18(7):315–322.
15. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: *mlst.net*. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(Web Server issue):W728–W733.
16. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. *mlstdbNet*—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*. 2004;5:86.
17. Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:595.
18. Harbottle H, White DG, McDermott PF, et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(7):2449–2457.
19. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics*. 2003;35(1):32–40.
20. Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D, Baggesen DL. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;63(2):173–184.
21. Simar SR, Hanson BM. Techniques in bacterial strain typing: past, present, and future. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(2):e0001121.
22. Walters MS, Witwer M, Lee YK, Albrecht V, Lonsway D, Rasheed JK, et al. Notes from the Field: Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Less Common Enterobacteriaceae Genera — United States, 2014–2017. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018;67(23):668–669.
23. Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(10):e01076-18.
24. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(7):1584–1590.
25. Emeraud C, Petit C, Gauthier L, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. Emergence of VIM-producing *Enterobacter cloacae* complex in France between 2015 and 2018. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022;77(5):1237–1243.

26. Vignaroli C, Di Sante L, Leoni F, Chierichetti S, Ottaviani D, Citterio B, Biavasco F. Multidrug-resistant and epidemic clones of *Escherichia coli* from natural beds of Venus clam. *Food Microbiology*. 2016;59:1–6.
27. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011;70(1):119–123.
28. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(3):490–495.
29. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(9):2598–2603.
30. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*. 1995;226(2):235–240.
31. Di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, Del Grosso M, Antonelli A, et al. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;75(6):1445–1453.