INDICE

1. **INTRODUZIONE**…… 2

1.1 *Genere Enterobacter*…… 4

1.2 *Enterobacter Cloacae Complex*…… 4

1.3 *Meccanismi di resistenza ai carbapenemi*…… 5

1.4 *Scopo della ricerca*…… 9

2. **MATERIALI E METODI**…… 10

2.1 *Ceppi batterici*…… 10

2.2 *Terreni di coltura e principali soluzioni utilizzate*…… 11

2.3 *Determinazione del resistotipo*…… 12

2.3.1 *Metodo modificato di inattivazione dei carbapenemi (mCIM)*…… 12

2.3.2 *Test qualitativi di diffusione in agar*…… 14

2.3.3 *Test quantitativi per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)*…… 15

2.4 *Determinazione del resistoma e tipizzazione molecolare*…… 16

2.4.1 *Estrazione del DNA genomico*…… 16

2.4.2 *PCR e PCR multiplex*…… 18

2.4.3 *Elettroforesi su gel d'agarosio*…… 20

2.4.4 *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)*…… 21

2.5 *Sequenziamento*…… 25

2.5.1 *Estrazione del DNA genomico*…… 25

2.5.2 *Valutazione quantitativa del DNA*…… 26

2.5.3 *Valutazione qualitativa del DNA*…… 26

2.5.4 *Assemblaggio ed analisi delle sequenze*…… 26

3. **RISULTATI**…… 27

3.1 *Sensibilità agli antibiotici*…… 27

3.2 *Tipizzazione molecolare*…… 28

3.3 *Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE*…… 32

4. **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**…… 34

4.1. *Conclusioni*…… 35

5. **BIBLIOGRAFIA**…… 36

1. INTRODUZIONE

Il fenomeno della resistenza agli antibiotici rappresenta uno dei più importanti problemi di Sanità a livello mondiale. Il trend della resistenza continua ad aumentare ed è particolarmente allarmante nell'ambito dei batteri Gram-negativi (Eichenberger, 2019). Ad oggi, infatti, la ricerca e lo sviluppo farmaceutico non sono riusciti a soddisfare la necessità clinica di nuovi antibiotici. Negli ultimi 20 anni, le uniche due nuove classi di antibiotici approvate dalle agenzie internazionali del farmaco (lipopeptidi ed oxazolidinoni) sono attive solo nei confronti dei Gram-positivi, mentre l'ultima classe molecolare efficace contro i Gram-negativi è quella dei chinoloni, introdotti nel 1962.

Come è noto, la resistenza agli antibiotici è un meccanismo naturale di risposta e di adattamento selettivo attuato dai batteri in virtù dell'uso, spesso improprio, di molecole antimicrobiche in medicina, ma anche in ambito veterinario e nella zootecnica. Occorre inoltre considerare che nel tempo, le industrie farmaceutiche hanno notevolmente ridotto gli investimenti per lo sviluppo di nuove molecole. A tutt'oggi, delle nuove decine di antibiotici in fase di studio, sono pochi quelli hanno attività nei confronti dei Gram-negativi e che sono in una fase avanzata di analisi clinica (Tacconelli, 2018). Nel complesso, tutte le cause e i fattori sopra elencati causano un aumento dei tassi di morbilità e mortalità, con importanti ricadute anche di tipo economico-assistenziale.

È fondamentale la comprensione dei meccanismi alla base dell'antibiotico-resistenza e l'epidemiologia molecolare. Difatti la conoscenza di tali meccanismi chiarisce non solo come la resistenza emerge, ma anche come essa si diffonda tra le specie batteriche e come viene acquisita dai pazienti. Questi studi sono a loro volta importanti per modificare e migliorare le caratteristiche farmacocinetiche di farmaci precedentemente approvati (Eichenberger, 2019).

I meccanismi di resistenza antimicrobica sono diversi: inattivazione enzimatica, modificazione del bersaglio, modificazione dei sistemi di trasporto in ingresso (porine e altre proteine carrier di membrana) e sistemi di efflusso (esporto). A seconda delle molecole possono essere espressi uno o più di questi meccanismi.

Il problema sanitario mondiale ha spinto la World Health Organization (WHO) nel 2017 a classificare i microrganismi resistenti agli antibiotici in tre categorie in base all'urgenza della necessità di sviluppare nuovi antibiotici. Le classi di priorità sono: 1-critica, 2-alta e 3-media.

Priorità 1: CRITICA	***Acinetobacter baumannii*** , carbapenem-resistant
	Pseudomonas aeruginosa , carbapenem-resistant
	Enterobacteriaceae , carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant
Priorità 2: ALTA	***Enterococcus faecium*** , vancomycin-resistant
	Staphylococcus aureus , methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant
	Helicobacter pylori , clarithromycin-resistant
	Campylobacter , fluoroquinolone-resistant
	Salmonella spp ., fluoroquinolone-resistant
	Neisseria gonorrhoeae , 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant
Priorità 3: MEDIA	***Streptococcus pneumoniae*** , penicillin-non-susceptible
	Haemophilus influenzae , ampicillin-resistant
	Shigella spp ., fluoroquinolone-resistant

Tabella 1. Classi di priorità (Tacconelli, 2018).

Il gruppo 1 comprende batteri resistenti ai carbapenemi e generalmente multiresistenti (MDR), quali le specie *Pseudomonas aeruginosa* ed *Acinetobacter baumannii* e l'intera famiglia delle *Enterobacteriaceae* che esprimono anche la resistenza alle cefalosporine di terza generazione. In questa famiglia sono incluse varie specie, responsabili di infezioni comunitarie e nosocomiali spesso difficili da trattare, alcune molto frequenti come *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli,* ed altre isolate con minor frequenza come i generi *Enterobacter, Serratia* e *Proteus*. Particolare attenzione va rivolta alle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE), poiché questi isolati hanno avuto un rapido incremento negli ultimi decenni. La comparsa dei CRE viene essenzialmente spiegata con la pressione selettiva sviluppatesi con il largo impiego di antibiotici in ambito ospedaliero, nello specifico di carbapenemi, contro batteri produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) che si erano diffusi dopo gli anni '80. Le opzioni di trattamento dei microrganismi resistenti ai carbapenemi sono limitate, tanto da aver spinto a reintrodurre l'uso della *Colistina*, nonostante siano già emerse delle resistenze anche contro di essa.

1.1. Genere *Enterobacter*

Il genere *Enterobacter* comprende bacilli Gram-negativi, aerobi-anaerobi facoltativi, mobili per mezzo di flagelli peritrichi, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Ad oggi all'interno del genere sono riconosciute ventidue specie (*E. aerogenes, E. amnigenus, E. arachidis, E. asburiae, E. carcinogenus, E. cloacae, E. cowanii, E. dissolvans, E. gergoviae, E. helveticus, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. mori, E. nimipressuralis, E. oryzae, E. pulveris, E. pyrinus, E. radicincitans, E. soli, E. taylorae* ed *E. turicensis*) (Davin-Regli, 2019). Questo genere è un membro degli ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp.), gruppo che comprende le principali specie batteriche responsabili delle infezioni nosocomiali ed in grado di sfuggire all'azione biocida degli antibiotici.

La resistenza agli antibiotici in *Enterobacter* spp. è dovuta a diversi meccanismi. Le due specie più frequentemente isolate, *E. aerogenes* ed *E. cloacae* hanno un fenotipo multi-resistente, a causa del loro adattamento all'ambiente ospedaliero e della loro capacità di acquisire facilmente numerosi elementi mobili genetici contenenti geni di resistenza e virulenza. Hanno una resistenza intrinseca *all'Ampicillina*, *all'Amoxicillina*, alle cefalosporine di prima generazione e alla *Cefoxitina* dovuta all'espressione di una β-lattamasi di tipo AmpC costitutiva; inoltre producono beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL).

1.2. *Enterobacter cloacae* complex

Tra le specie appartenenti al genere *Enterobacter* sette sono raggruppate all'interno del gruppo complesso *Enterobacter cloacae: E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. mori* ed *E. nimipressuralis* (Davin-Regli, 2019). Queste specie condividono caratteristiche fenotipiche ma soprattutto genetiche (in base agli studi di ibridazione DNA-DNA e di sequenziamento dell'intero genoma); difatti *E. cloacae* condivide almeno il 60% di omologia nel suo genoma con gli altri sei membri. Le specie e sottospecie comprese sono difficili da identificare correttamente utilizzando metodi fenotipici tradizionali e moderne tecnologie quali MALDI-TOF; di conseguenza gli isolati ECC sono spesso erroneamente assegnati alla specie tipo *E. cloacae*.

E. aerogenes, E. cloacae ed *E. hormaechei* sono i ceppi più frequentemente isolati nei campioni clinici umani, specialmente in pazienti immunocompromessi e ricoverati nei reparti di terapia intensiva.

E. cloacae è naturalmente resistente *all'Ampicillina*, *all'Amoxicillina*-acido clavulanico, alla *Cefalotina* e alla *Cefoxitina* grazie alla produzione a basso livello di una cefalosporinasi naturale inducibile di classe C. Mutazioni a livello di questo enzima a codificazione cromosomica possono condurre alla resistenza di un grande numero di β-lattamici, soprattutto alle cefalosporine di terza generazione, escluso il *Cefepime*. La resistenza mediata da AmpC rappresenta, da sola, il 50% della resistenza ai β-lattamici nei ceppi clinici ed è spesso associata all'espressione di ESBL. In *E. cloacae* sono stati identificati vari enzimi ESBL come TEM, SHV e CTX-M. La tendenza ad acquisire geni ed elementi genetici di resistenza ha contribuito negli ultimi anni all'emergenza e alla diffusione di ceppi ECC resistenti ai carbapenemi, con prevalenze variabili a livello geografico.

1.3 Meccanismi di resistenza ai carbapenemi

I carbapenemi sono antibiotici facenti parte della classe dei β-lattamici, questi sono un vasto gruppo caratterizzato dalla presenza di un core molecolare funzionale, l'anello β-lattamico, la cui integrità è alla base dell'attività antimicrobica e del meccanismo d'azione di interferire con la sintesi del peptidoglicano. I β-lattamici sono suddivisi in penicilline (come *Amoxicillina* e *Oxacillina*), cefalosporine (come *Ceftazidime* e *Cefepime*), monobattami (*Aztreonam*) e carbapenemi (come *Ertapenem*, *Meropenem* e *Imipenem*). La resistenza ai carbapenemi è di grande rilevanza clinica, in quanto sono considerati farmaci di ultima generazione.

In *Enterobacter* spp., così come in generale nella famiglia *Enterobacteriaceae* la resistenza ai carbapenemi è dovuta principalmente ai seguenti meccanismi: (I) inattivazione enzimatica mediata dalla produzione di carbapenemasi, (II) espressione di pompe di efflusso e (III) diminuzione delle permeabilità della membrana esterna attraverso mutazioni delle porine. Contribuiscono alla resistenza altri meccanismi quali la produzione di ESBL e/o una maggiore espressione degli enzimi AmpC-like. I meccanismi non sono mutualmente esclusivi perciò possono anche coesistere.

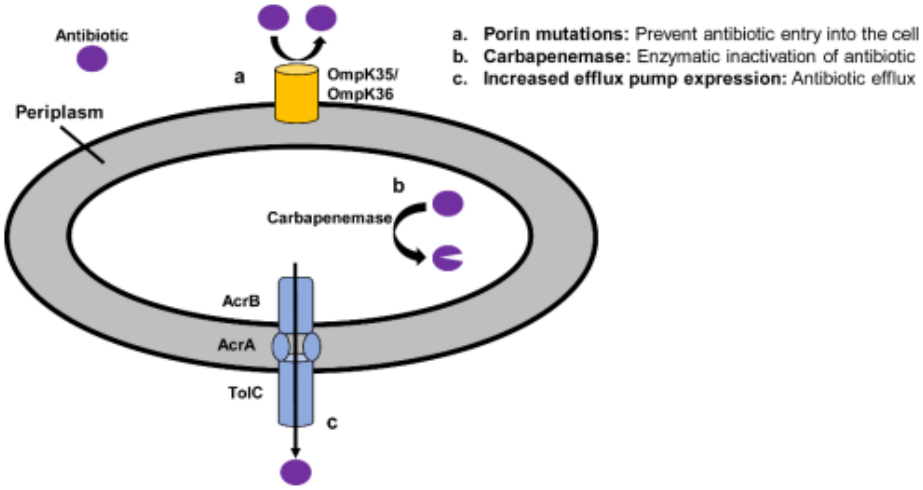


Figura 1. Illustrazione dei principali maccanismi di resistenza ai carbapenemi delle *Enterobacteriaceae*.

I. <u>Produzione di carbapenemasi</u>

L'espressione delle carbapenemasi è un meccanismo di resistenza particolarmente comune ed è anche il meccanismo primario della non suscettibilità dei carbapenemi nelle *Enterobacteriaceae*, nonché il più rilevante clinicamente. Le carbapenemasi e le β-lattamasi in generale vengono classificate in base alla loro struttura molecolare attraverso il sistema di classificazione Ambler, che distingue quattro classi indicate con le lettere da A a D (**Figura 2**).

Table 1. Ambler classification of β–lactamases.

Ambler Class	β-Lactamases	Active Site Agent	Examples	Substrates
A	Penicillinases	Serine	PSE TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, GES KPC, SME, IMI/NMC-A	Penicillins Penicillins, 3rd generation cephalosporins All β-lactams
B	Metallo-β-lactamases	Zinc	IMP, VIM, NDM, SPM, GIM	All β-lactams, except monobactams
C	Cephalosporinases	Serine	AmpC	Cephamycins, 3rd generation cephalosporins
D	Oxacillinases	Serine	OXA	All β-lactams, though class D enzymes have highly variable spectra of activity

Abbreviations: CTX-M, active against cefotaxime (CTX) and isolated in Munich (-M); GES, Guiana extended spectrum; GIM, German imipenemase; IMP, active on imipenem; KPC, Klebsiella pneumoniae carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; NMC, not metalloenzyme carbapenemase; OXA, oxacillinase; PER, Pseudomonas aeruginosa RNL-1; PSE, Pseudomonas specific enzyme; SHV, sulfhydrl reagent variable; SME, Serratia marcescens enzyme; SPM, Sao Paulo metallo- β -lactamase; VEB, Vietnamese extended-spectrum β-lactamase; VIM, Verona integron-encoded metallo-β-lactamase.

Figura 2. Classificazione Ambler delle beta-lattamasi (Eichenberger, 2019).

Classe A. Richiedono serina nel loro sito attivo. Sono incluse anche le ESBL, come TEM, SHV, CTX-M e GES, e la serina-carbapenemasi (KPC). Conferiscono la resistenza a cefalosporine di seconda e terza generazione, oltre che a penicilline, carbapenemi e monobattami. Sono costituite principalmente dalla *K. pneumoniae* carbapenemasi (KPC).

Classe B (MBLs). Denominate metallo-β-lattamasi in quanto sfruttano un cofattore enzimatico, lo zinco, essenziale per la scissione dell'anello β-lattamico. Sono efficaci contro penicilline, cefalosporine e carbapenemi ma non nei confronti dei monobattami, cioè dell'*Aztreonam*. La loro azione viene inibita da chelanti metallici come l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), ma non da inibitori delle β-lattamasi usate comunemente, quali acido clavulanico, tazobactam e avibactam.

Le MBL di classe B sono prevalentemente codificate da geni collocati su elementi trasferibili. Gli enzimi più importanti e diffusi sono: VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase), IMP (per "attivo su *Imipenem*") e NDM (New Delhi metallo-β-lactamase enzymes).

La carbapenemasi VIM è la MBL più frequentemente riportata in tutto il mondo, sebbene sia relativamente rara nelle *Enterobacteriaceae* (Eichenberger, 2019). L'enzima VIM-1 è stato descritto per la prima volta a Verona in un ceppo di *P. aeruginosa*; ad oggi sono state descritte oltre 70 varianti della carbapenemasi VIM suddivise in tre sottogruppi: VIM-1-like, VIM-2-like e VIM-7-like (Emeraud, 2022).

Le *Enterobacteriaceae* produttrici di VIM si trovano in gran parte in Italia, Grecia, Spagna e Ungheria (Eichenberger, 2019).

Classe C. Sono delle cefalosporinasi, come l'enzima considerato prototipo del gruppo, AmpC. Hanno azione idrolitica nei confronti di penicilline e cefalosporine, e possono avere una debole attività carbapenemasica.

Classe D. Costituite da β-lattamasi OXA, alcune delle quali sono in grado di idrolizzare i carbapenemi. Nelle *Enterobacteriaceae* le più frequentemente riscontrate sono gli enzimi OXA-48-like, che idrolizzano debolmente i carbapenemi ma non le cefalosporine a spettro esteso. Le *Enterobacteriaceae* produttrici di OXA-48 si sono diffuse nei paesi limitrofi in Europa, mentre sono rare negli Stati Uniti (Eichenberger, 2019).

II. Pompe di efflusso

Si tratta di pompe proteiche multifunzione, che possono conferire resistenza a diversi antibiotici, antisettici e altre sostanze inibenti la crescita batterica. Rappresentano un meccanismo aggiuntivo, e svolgono un ruolo secondario rispetto alle carbapenemasi ma comunque importante nella resistenza dei Gram-negativi.

Le pompe di efflusso appartengono alla famiglia delle RND (resistance-nodulation-division), una di queste è la pompa AcrAB-TolC identificata in molte specie della famiglia *Enterobacteriaceae*, costituita da un complesso proteico che si estende sulla membrana interna, sul periplasma e sulla membrana esterna per espellere gli antibiotici all'esterno della cellula (Eichenberger, 2019).

III. Modificazioni delle porine

Singolarmente non determinano una piena resistenza a diversi carbapenemi, ad eccezione di quando le mutazioni ai geni codificanti sono associate con la produzione e l'iper-espressione di enzimi AmpC o ESBL. Tali enzimi, infatti, possiedono una bassa e lenta attività idrolitica nei confronti dei carbapenemi ed in combinazione con cambiamenti di porine si crea il cosiddetto "fenomeno dell'intrappolamento dell'antibiotico" in cui il carbapenemico è legato irreversibilmente dalla β-lattamasi, che ne blocca la sua azione ma non lo degrada (Eichenberger, 2019).

1.4 Scopo della ricerca

La resistenza ai carbapenemi è una problematica di salute pubblica globale, in quanto si tratta di antibiotici di "ultima linea" per il trattamento delle infezioni causate da batteri multiresistenti (MDR) Gram-negativi, ma il loro utilizzo è limitato dalla diffusione dei cosiddetti ceppi CRE (*Carbapenem-resistant Enterobacterales*). Il meccanismo di resistenza principale, ad oggi, è la produzione di carbapenemasi, che può conferire resistenza verso tutti o quasi tutti i β-lattamici. La rilevanza è altresì dovuta alla rapida diffusione dei geni codificanti i principali tipi di enzimi (IMP, VIM, KPC, OXA-48, NDM) che sono veicolati da elementi genetici mobili e trasmissibili attraverso plasmidi coniugativi nelle diverse specie batteriche. Gli studi di sorveglianza ed epidemiologici sulla diffusione delle diverse carbapenemasi mostrano una continua evoluzione e cambiamento sia in termini di specie batteriche che tipo di carbapenemasi prodotta (Emeraud, 2022).

Per esempio, nel biennio 2012-2014, in Francia, gli isolati ECC resistenti ai carbapenemi erano il gruppo più comunemente isolato dopo *K. pneumoniae* ed *E. coli*; tuttavia, negli anni successivi è stato osservato un aumento significativo del numero di isolati ECC produttori di carbapenemasi VIM, apparentemente non geneticamente correlati. Anche in Italia, sono state riportate diverse segnalazioni di ceppi produttori dell'enzima VIM (Arcari, 2020; Marchetti, 2021).

Considerando che anche in Italia è in corso un cambiamento nella distribuzione dei ceppi CP-CRE, delle classi di carbapenemasi e dei cloni ad "alto rischio" (Di Pilato, 2020), in questo studio è stata analizzata una collezione di ceppi CRE, produttori di VIM, sia appartenenti al gruppo *Enterobacter cloacae* complex, che ad altre specie, isolati da campioni clinici di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche nel periodo 2021-2023. I ceppi sono stati analizzati e confrontati per le loro proprietà di resistenza fenotipiche e genotipiche; sono inoltre state condotte indagini di tipizzazione e sequenziamento per studiare la relazione clonale tra i ceppi.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

Sono stati analizzati 12 ceppi batterici appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, provenienti dall'Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche di Ancona Torrette. Tutti i ceppi sono stati isolati da diversi materiali clinici nel periodo compreso tra 2021 e prima metà 2023. I ceppi sono stati identificati mediante il MALDI-TOF ed appartenenti a *Enterobacter cloacae complex* (ECC) e *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) (**Tabella 2**).

Specie	ID ceppo	Campione clinico	Reparto	Anno di isolamento
ECC 10	748301	Urine	Emodialisi	2022
ECC 11	766462	Urine	Nefrologia	2022
ECC 12	770821	Urine	Clinica di malattie infettive	2022
ECC 13	823789	Urine	Nefrologia	2023
ECC 14	825795	Tampone rettale	Clinica di malattie infettive	2023
Kpn 1	703527	Tampone rettale	Nefrologia	2021
Kpn 2	705393	Tampone rettale	Neurochirurgia	2021
Kpn 3	773964/1	Urine	Nefrologia	2022
Kpn 4	802548	Urine	Pronto soccorso	2022
Kpn 5	805710	Urine	Pronto soccorso	2022

Tabella 2. Ceppi batterici analizzati nello studio.

2.2 Terreni di coltura e principali soluzioni utilizzate

I principali terreni di coltura utilizzati per la crescita, l'isolamento e la determinazione della sensibilità agli antibiotici sono stati ottenuti dalla ditta OXOID (Garbagnate, MI).

MacConkey Agar (MC) → Terreno di elezione dei Gram-negativi. Si tratta di un terreno selettivo poiché in grado di inibire la crescita dei Gram-positivi grazie alla presenza di Sali biliari e Cristalvioletto, e differenziale contenendo come unica fonte di carbonio il lattosio e come indicatore di pH il rosso neutro che permettono di distinguere i batteri lattosio fermentanti e non-fermentati grazie al viraggio di colore del terreno stesso. Difatti i fermentati il lattosio presentano colonie rosa/viola mentre i non fermentanti presentano colonie incolori e trasparenti.

Mueller Hinton Agar (MHA) → Terreno non selettivo e non differenziale, composto da estratto di carne, idrolizzato acido di caseina, amido e agar. Utilizzato per l'esecuzione dei test di sensibilità agli antibiotici (antibiogramma) con il metodo della disco diffusione (Kirby-Bauer).

Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient agar (CLED) → Terreno non selettivo e differenziale per la presenza del Blu di bromotimolo (indicatore di pH) che consente di rilevare le colonie lattosio fermentanti. La fermentazione del lattosio determina il viraggio del terreno dal blu/verde al giallo. Particolarmente indicato per la batteriologia urinaria.

Brilliance CRE → Terreno cromogenico, selettivo e differenziale che permette la rilevazione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi.

Muller Hinton II Brodo (MHB) → Terreno liquido composto da estratto di carne, idrolizzato di caseina, amido e addizionato con ioni calcio e magnesio, con basse concentrazioni di timina e timidina. Utilizzato per l'esecuzione dei test di sensibilità agli antibiotici con il metodo della microdiluizione in brodo (Minima Concentrazione Inibente, MIC).

Brain Heart Infusion Brodo (BHB) → Terreno liquido nutritivo non selettivo, che contiene infuso di cuore e cervello di origine bovina o suina, cloruro di sodio, glucosio e sodio fosfato bifasico. Viene utilizzato per la crescita e il mantenimento di batteri esigenti.

Tryptic Soy Broth (TSB) → Terreno liquido altamente nutritivo, grazie alla presenza del triptone e del peptone di soia permette la crescita di batteri esigenti senza dover arricchire il terreno.

BH + Glicerolo → Substrato liquido utilizzato per la conservazione dei ceppi batterici alla temperatura di -70°C per medio-lunghi periodi di tempo. Per il mantenimento le colture pure vengono prelevante tramite un tampone sterile e stemperate in 1 ml di BH addizionato con il 20% di Glicerolo.

Tris-Acetato-EDTA (TAE) → Tampone di corsa dell'elettroforesi su gel di agarosio per la separazione degli acidi nucleici. È composto da Tris base, EDTA 0,5 M pH 8, Acido Acetico Glaciale e H_2O ultrapura.

Tris-Borato-EDTA (TBE) → Tampone di corsa della PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), ha un potere tamponante maggiore rispetto al TAE che permette una migliore risoluzione ed è quindi adatto all'impego di voltaggi superiori richiesti nella PFGE. È composto da Tris base, EDTA, Acido borico e H_2O ultrapura.

2.3 Determinazione del resistotipo

La determinazione del resistotipo, ovvero il profilo di resistenza agli antibiotici, dei ceppi in studio è stato ottenuto mediante le diverse procedure riportate di seguito.

2.3.1 Metodo modificato di inattivazione dei carbapenemi (mCIM)

Test fenotipico volto alla verifica della presenza di carbapenemasi, ovvero enzimi prodotti dal batterio in grado di inibire l'azione dell'antibiotico, che rappresenta il principale meccanismo di resistenza degli enterobatteri. Il test fenotipico rileva l'attività carbapenemasica prodotta dal ceppo nei confronti dell'antibiotico *Meropenem* (MER), ma non consente la distinzione tra i diversi enzimi, per cui è richiesto un test genotipico. Di seguito è indicata la procedura seguita, secondo la letteratura di riferimento (Pierce, 2017).

Le aliquote (1 µl) del ceppo in esame vengono sospese in 2 ml di TSB, la sospensione così ottenuta viene agitata al vortex per 10-15 s. Si aggiunge sterilmente un dischetto di *Meropenem* (MEM) da 10 µg e si procede ad incubare per 4h ± 15 min a 35°C ± 2°C. Poco prima del termine del periodo di incubazione, durante il quale avviene l'eventuale inattivazione dei carbapenemi, viene preparata una sospensione con torbidità equivalente ad uno standard 0,5 di McFarland del ceppo indicatore [*Escherichia coli* ATCC (American type colture collection) 25922]. Questa sospensione andrà distribuita in maniera uniforme su una piastra MHA.

Al termine del periodo di incubazione il dischetto di *Meropenem* (MER) viene rimosso dalla sospensione batterica con un'ansa da 10 µl, ponendo attenzione a trascinare l'ansa lungo il bordo della provetta in modo da eliminare il liquido in eccesso. Il dischetto viene posizionato sulla piastra MHA inoculata precedentemente e si procede con una seconda incubazione per 18-24°C a 35°C ± 2°C.

L'interpretazione dei risultati consiste nel misurare il diametro dell'alone di inibizione del ceppo indicatore (ATCC 25922) nei confronti del dischetto di MEM trattato con i ceppi test. (**Tabella 3**. Interpretazione dei risultati mCIM) (Pierce, 2017).

Diametro zona di inibizione	Risultati mCIM
6-15 mm	Positivo
18-18 mm	Intermedio
≥ 19 mm	Negativo

Tabella 3. Interpretazione dei risultati di mCIM.

2.3.2 Test qualitativi di diffusione in agar

La valutazione qualitativa della sensibilità agli antibiotici è stata eseguita tramite il metodo della disco-diffusione in agar, secondo le direttive dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (https://eucast.org.).

Preparare una coltura pura del ceppo in esame in idoneo terreno ed incubare overnight a 35°C ± 2°C. Preparare una sospensione stemperando alcune colonie in MHB. Con la sospensione allestita verranno effettuate opportune diluizioni in modo da ottenere un inoculo standardizzato con densità ottica (O.D) 0,1 misurata ad una lunghezza d'onda (λ) di 625 nm, che corrisponde a circa 1 x 10^8 Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml). Con un tampone sterile si distribuisce in maniera uniforme l'inoculo sulla superficie di una piastra MHA, su cui si applicano sterilmente i dischetti degli antibiotici da saggiare. Si procede all'incubazione overnight in aerobiosi a 35°C ± 2°C. Misurare i diametri di inibizione per ciascun antibiotico e confrontare gli *endpoint* ottenuti ai valori di *breakpoint* riportati nella **Tabella 4** (EUCAST v_12.0_Breakpoint Tables).

Antibiotico	**Concentrazione dischetto (µg)**	**Zone Diameter Breakpoint (mm)**	
		S	**R**
Aztreonam (ATM)	30	≥ 26	< 21
Amikacina (AK)	30	≥ 18	< 18
Ciprofloxacina (CIP)	5	≥ 25	< 22
Ertapenem (ETP)	10	≥ 25	< 25
Cefepime (FEP)	30	≥ 27	< 24
Gentamicina (GEN)	10	≥ 17	< 17
Imipenem (IMI)	10	≥ 22	< 19
Meropenem (MER)	10	≥ 22	< 16
Ceftazidime (CAZ)	10	≥ 22	< 19
Cefiderocol (FDC)	30	≥ 22	< 22
Ceftazidime/Avibactam (CZA)	10-4	≥ 13	< 13

Tabella 4. Valori di riferimento per l'interpretazione dei diametri di inibizione dei ceppi *Enterobacterales.*

2.3.3 Test quantitativi per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il metodo della microdiluizione in brodo è stato utilizzato per ottenere il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC) dei ceppi in esame agli antibiotici: *Imipenem* (IMI), *Meropenem* (MER), *Ertapenem* (ETP), *Aztreonam* (ATM), *Ciprofloxacina* (CIP), *Gentamicina* (GEN), *Colistina* (COL), *Amikacina* (AK), *Ceftazidime* (CAZ), *Cefepime* (FEP), *Ceftazidime/Avibactam* (CZA), *Cefiderocol* (FDC), in accordo con le procedure standardizzate EUCAST. La microdiluizione in brodo è una misura quantitativa dell'attività di un determinato antibiotico verso un ceppo batterico, e permette di individuare la MIC, definita come la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica visibile.

La validità dei risultati ottenuti è assicurata dall'utilizzo di ceppi di riferimento ATCC indicati dalle linee guida, nel caso specifico *Escherichia coli* ATCC 25922, che rappresenta il ceppo controllo qualità (QC) per *Enterobacteriaceae.* Le linee guida indicano il range del ceppo QC per ciascun antibiotico e consentono di validare i risultati dell'esperimento con i ceppi in esame.

Il procedimento consiste nel preparare in MHB una soluzione alla concentrazione doppia rispetto alla più alta da testare di antibiotico. Per le sospensioni batteriche si procede con l'ottenimento dell'inoculo standardizzato (1×10^8 UFC/ml), come descritto in precedenza, successivamente viene effettuata una diluizione 1:100 in modo da ottenere una concentrazione finale in ogni pozzetto della microtiter di 5×10^5 UFC/ml. Le microtiter vengono allestite in sterilità, sotto cappa a flusso laminare, dispensando 50 µl di MHB nella totalità dei pozzetti ad eccezione della prima colonna, nella quale verranno dispensati 100 µl di antibiotico, precedentemente allestito, e si procede con diluizioni scalari 1:2 fino alla penultima colonna. Al termine della procedura si addizionano 50 µl di sospensione batterica precedentemente preparata. L'ultima colonna contiene solo MHB e rappresenta il controllo positivo per la crescita batterica. Si incubano le microtiter a 37°C overnight ed al termine si procede con la lettura dei risultati. Dopo aver verificato la crescita dei pozzetti di controllo positivo ed i risultati relativi al ceppo ATCC, si procede con la lettura di tutti i ceppi batterici in esame.

L'interpretazione dei dati ottenuti viene eseguita utilizzando i valori di breakpoint forniti dall'EUCAST (EUCAST v_12.0_Breakpoint Tables) (**Tabella 5**).

Antibiotico	**MIC breakpoints (mg/L)**	
	S	**R**
Imipenem (IMI)	≤ 2	> 4
Meropenem (MER)	≤ 2	> 8
Ertapenem (ETP)	≤ 0.5	> 0,5
Aztreonam (ATM)	≤ 1	> 4
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 0,25	> 0,5
Gentamicina (GEN)	≤ 2	> 2
Colistina (COL)	≤ 8	> 8
Amikacina (AK)	≤ 8	> 8
Ceftazidime (CAZ)	≤ 1	> 4
Cefepime (FEP)	≤ 1	> 4
Ceftazidime/Avibactam (CZA)	≤ 8	> 8
Cefiderocol (FDC)	≤ 2	> 2

Tabella 5. Valori di riferimento per l'interpretazione dei valori di MIC per *Enterobacterales.*

2.4 Determinazione del resistoma e tipizzazione molecolare

La determinazione dei geni di resistenza, ovvero il resistoma, è stata eseguita mediante tecniche di amplificazione, quali PCR e PCR multiplex, previa estrazione e purificazione del DNA dei ceppi batterici. Successivamente, sono state utilizzate tecniche di tipizzazione per confrontare i diversi genomi (XbaI-PFGE) e per visualizzare la presenza di plasmidi (S1-PFGE).

2.4.1 Estrazione del DNA genomico

Processo che permette la separazione dell'acido nucleico dai detriti e componenti cellulari, che sono considerati degli interferenti per le successive analisi. L'estrazione del DNA dei ceppi in esame è stata eseguita con l'utilizzo di un kit, il GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich), seguendo il protocollo specifico per i Gram-negativi fornito dalla ditta produttrice e riportato di seguito.

Prelevare mediante l'utilizzo di un tampone sterile una modesta quantità di colonie batteriche, da una coltura pura, e stemperarle in 1,5 ml di soluzione fisiologica. Centrifugare per 2 minuti a 12.000-16.000 g ed eliminare il surnatante, risospendere il pellet in 180 µl di Lysis Solution T (presente nel kit). Addizionare 20 µl di Rnasi A Solution (per degradare il contenuto in RNA) ed incubare a temperatura ambiente per 2 minuti, successivamente aggiungere 20 µl della soluzione di Proteinasi K (20.000 µg/ml), per la rottura delle membrane cellulari, e miscelare ed incubare per 30 minuti a 55°C. Al termine dell'incubazione unire 200 µl di Lysis Solution C, agitare al vortex per 15 s ed incubare per 10 minuti a 55°C.

Durante il periodo di incubazione assemblare la colonnina (fornita dal kit) con una Eppendorf da 2 ml e addizionare 500 µl di Column Preparation Solution, centrifugare a 12.000 g per 1 minuto ed eliminare l'eluito. Questo passaggio permette di massimizzare il legame del DNA alla colonnina.

Al termine dell'incubazione aggiungere 200 µl di etanolo al 95-100% al lisato (per far precipitare il DNA) ed agitare al vortex per 5-10 s, trasferire la totalità del lisato nella colonnina preparata in precedenza e centrifugare a 12.000 g per 1 minuto ed eliminare l'eluito trasferendo la colonna in una nuova Eppendorf da 2 ml.

Si procede con il primo lavaggio con 500 µl di Wash Solution 1, centrifugare a 12.000 g per 1 minuto ed eliminare l'eluito. Si esegue il secondo lavaggio con 500 µl di Wash Solution Concentrate centrifugando alla massima velocità per 3 minuti ed eliminare l'eluito. Centrifugare nuovamente la colonnina alla massima velocità per 1 minuto in modo da eliminare eventuali residui e trasferire nuovamente la colonnina in una nuova Eppendorf da 2 ml.

Addizionare 200 µl di Eluition Solution o in alternativa acqua MilliQ sterile preriscaldata a 60°C ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente in modo da aumentare l'efficienza di eluizione, centrifugare successivamente a 12.000 g per 1 minuto. Infine, eliminare la colonnina e conservare l'eluito finale contenente il DNA genomico purificato a -20°C.

2.4.2 PCR e PCR Multiplex

La tecnica di amplificazione PCR (Polymerase Chain Reaction) permette di ottenere rapidamente milioni di copie identiche di DNA a partire da una quantità iniziale minima di acido nucleico, che funge da stampo. La PCR si effettua in uno strumento denominato Termociclatore, che è in grado di alternare automaticamente le diverse temperature che caratterizzano le tre fasi della PCR, ovvero *denaturazione*, *annealing* e *polimerizzazione*. Queste fasi si ripetono per un numero *n* di cicli che variano a seconda dei protocolli.

La tecnica PCR è stata utilizzata per la ricerca, nei ceppi batterici in esame, dei geni *bla* (**Tabella 6**) che codificano per le principali tipologie di carbapenemasi (KPC, IMP, NDM, OXA-48 e VIM), β-lattamasi a spettro esteso (CTX-M) ed altri enzimi di β-lattamasi.

GENI *bla* RICERCATI	Classe Ambler	Bush-Jacoby group
TEM	A	2b – 2be – 2br – 2ber
SHV	A	2b – 2be – 2br
CTX-M	A	2be
KPC	A	2f
VIM	B	3a
IMP	B	3a
NDM	B	3a
OXA-1	D	2d
OXA-48	D	2df

Tabella 6. Geni *bla* ricercati, suddivisi nelle classi Ambler e Bush-Jacoby (Bush, 2010).

Nello studio sono stati utilizzati primer e procedure presenti in letteratura (Poirel, 2011) (**Tabella 7**) per la ricerca delle principali carbapenemasi, così come anche per le principali β-lattamasi di classe A (TEM, SHV, OXA) sempre seguendo i protocolli presenti in letteratura (Dallenne, 2010). In tutte le amplificazioni è stato utilizzato l'enzima DreamTaq (Thermo Fisher Scientific). Le concentrazioni e i volumi finali dei componenti utilizzati sono indicati di seguito.

Componente	Concentrazione finale	Volume finale
DreamTaq	1 U	0,2 µl
Buffer 10X	1X	5 µl
Primers	0,4 µM	0,2 µl a primer
dNTP	200 µM	1 µl
DNA genomico	non indicata	2 µl
H_2O MilliQ sterile e Dnasi free		portare a volume fino a 50 µl

GENE	PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	DIMENSIONE (bp)
TEM	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800bp
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV	MultiTSO-T_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713bp
	MultiTSO-T_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
OXA-1	MultiTSO-T_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564bp
	MultiTSO-T_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
VIM	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390bp
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
NDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621bp
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
OXA-48	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438bp
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	
KPC	KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798bp
	KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	
IMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232bp
	IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC	

Tabella 7. Primer di geni di resistenza (Poirel 2011 e Dallenne 2010).

2.4.3 Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare macromolecole di acido nucleico in base al diverso peso molecolare mediante l'applicazione di un campo elettrico creato dalla presenza di un anodo e di un catodo ai lati della cella elettroforetica. Le molecole di DNA sono cariche negativamente e migrano verso il catodo (polo positivo) ad una velocità inversamente proporzionale alla dimensione dei diversi frammenti. La separazione è resa possibile dal setaccio molecolare creato dalla matrice di agarosio che compone il gel. La visualizzazione dei frammenti in seguito alla loro separazione è possibile mediante l'impiego di sostanze fluorescenti in grado di intercalarsi nella doppia elica del DNA. Viene impiegato un marker con dimensioni molecolari note (100 bp, 100 bp plus, ditta Thermo Scientific) che permette di risalire alla dimensione dei frammenti in esame.

La corsa elettroforetica avviene su un gel d'agarosio (1-2%) in un tampone di corsa (TAE). Viene applicato un voltaggio costante di 80-90 V per 30-40 minuti. Per la preparazione di un gel di agarosio all'1% i componenti sono riportati di seguito:

- 1 g di agarosio (Agarose D-1 LE Standard for Molecular Biology- Fisher Molecular Biology)
- 100 ml TAE 0,5X
- 300 µl di GreenGel (Società Italiani Chimici): intercalante fluorescente che permette la visualizzazione al transilluminatore
- 5 µl di Marker 100 bp plus: marker molecolare composto da frammenti di dimensioni note con un range di 100-3000 bp che permette di valutare la qualità della corsa e la dimensione dei frammenti in esame.
- 2 µl di Loading Dye 6X (Thermo Fischer Scientific): miscela che permette di visualizzare l'andamento della corsa elettroforetica e facilita la deposizione del campione nel pozzetto del gel.

La procedura prevede di pesare l'agarosio e di addizionarlo al TAE, riscaldando fino ad ottenere un composto limpido e trasparente. Successivamente aggiungere l'intercalante GreenGel e lasciar solidificare il gel nell'apposito supporto posizionando il pettine per la creazione dei pozzetti. Il gel solidificato viene trasferito nella cella di elettroforesi contenente il tampone di corsa TAE. Procedere prima con il caricamento del marker e successivamente 10 µl di ogni campione miscelato con 2 µl di Loading Dye. Chiudere la cella con l'apposito coperchio ed attivare il circuito; al termine della corsa il gel viene visualizzato al transilluminatore UV.

2.4.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE è una tecnica particolare di elettroforesi che permette di separare frammenti di DNA di dimensione maggiore (10-800 kb) rispetto alla classica elettroforesi, grazie all'applicazione di un campo elettrico che cambia periodicamente direzione. L'angolo compreso tra gli elettrodi e la velocità di questo cambiamento sono determinati dai valori di *switch time, field angle* e *ramping factor*. I frammenti si ottengono mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione che effettuano la digestione specifica e riproducibile del DNA genomico, la posizione dei frammenti al termine della corsa viene detto "Dna Fingerprint" poiché è specifica per ogni specie.

L'intera procedura è stata eseguita secondo il protocollo del CDC "Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri"(www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf), con alcune modifiche.

Materiali	
TE buffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 in acqua sterile ultrapura
Cell Suspension Buffer	100 mM Tris, 100 mM EDTA pH 8.0 in acqua sterile ultrapura
Cell Lysis Buffer	50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Sarcosyl in acqua sterile ultrapura
Gel di agarosio	1% Low melting-point agarose (Bio-Rad) 1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)
TBE 0.5 X	Si prepara una soluzione di lavoro alla concentrazione 0,5 X a partire dalla concentrazione di 10 X a pH 8,3, i componenti sono: 107,81 g Tris, 3,72 g EDTA, 55,04 g Acido borico in acqua sterile ultrapura

Protocollo comune	
Preparazione plugs	Prelevare in sterilità, da una coltura overnight, poche colonie e sospendere in 2 ml di Suspension Buffer; Ottenere inoculi standardizzati misurando la densità ottica (O.D) ad una lunghezza d'onda (λ) di 610 nm; Addizionare alla sospensione 400 µl di Low melting-point agarose, miscelare e dispensare 100 µl nel "plug mold", stampo apposito, al fine di ottenere le plugs.
Lisi cellulare	Trasferire le plugs ben solidificate in 5 ml di Lysis Buffer e 25 µl di Proteinasi K (20 µg/ml), mescolare per inversione e porre in incubazione a 55°C per 2 ore; Effettuare 2 lavaggi con 5 ml di acqua sterile ultrapura e 4 lavaggi con TE Buffer entrambi pre-riscaldati a 55°C; Al termine dei lavaggi, lasciare le plugs in 5-10 ml di TE buffer a temperatura ambiente. Conservare le plugs non utilizzate in frigorifero a 4°C.

Protocollo digestione enzimatica mediante XbaI

XbaI (5'-T CTAGA-3') è l'endonucleasi di restrizione scelto per le analisi; esso taglia infrequentemente il DNA dei batteri Gram-negativi e permette il confronto dei profili dei ceppi in esame.

1. Preparare la soluzione in una Eppendorf miscelando 20 µl del buffer specifico di restrizione (concentrazione finale 1X) e 4 µl di XbaI (concentrazione finale 40 U) in acqua sterile ultrapura per un volume totale di 200 µl;
2. Aggiungere all'incirca mezza plug ed incubare a 37°C per circa 2 h;
3. Procedere al caricamento dei campioni digeriti su apposito supporto.

Protocollo digestione enzimatica mediante S1

L'enzima S1 è una nucleasi, prodotta da *Aspergillus oryzae*, che permette di analizzare il numero di plasmidi nei ceppi batterici in esame.

1. Come per la preparazione della miscela di digestione con XbaI, porre in una Eppendorf 30 µl di buffer specifico con 0,75 µl di enzima S1 (concentrazione finale di 75 U); aggiungere acqua sterile ultrapura per un volume finale di 200 µl ed infine addizionare circa la metà di una plug;
2. Incubare a temperatura ambiente per circa 30 minuti;
3. Bloccare la digestione enzimatica mediante aggiunta di 500 µl di EDTA 0,1 M pH 8.0.

Preparazione del gel

1. Posizionare il marker specifico (Lambda PFG Ladder per XbaI, size range: 48.5 - 1,018 kb, New England Biolabs I e Midrange PFG Marker per S1, size range: 15–291 kb, New England Biolabs), contenente i frammenti di DNA a peso molecolare noto ed i campioni digeriti sull'apposito pettine, usando una piccola quantità di Low melting-point Agarose mantenuto fuso;
2. Posizionare il pettine nel sistema e versare delicatamente il gel Pulsed Field Certified Agarose all' 1% in TBE 0,5X, precedentemente preparato, avendo cura di non creare bolle d'aria;
3. Attendere che il gel si sia completamente solidificato prima di rimuovere il pettine.

Corsa elettroforetica

Le corse sono state eseguite mediante l'apparecchiatura CHEF MAPPER XA SYSTEM (Bio-Rad) con annesso un circuito di pompa refrigerante per permettere il mantenimento della temperatura a 14°C. I valori di elettroforesi impostati sono differenti a seconda dell'enzima utilizzato e sono illustrati di seguito (**Tabella 8**).

Parametri	**Xba I**	**S1**
Field Angle	120°	120°
Run time	22 ore	18 ore
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

Tabella 8. Parametri utilizzati per le corse elettroforetiche.

Lettura dei risultati ed interpretazione

Terminata la corsa elettroforetica si procede con la colorazione del gel con Bromuro d'Etidio (concentrazione finale 0,5 µg/ml) per circa 30 minuti. La visualizzazione avviene al transilluminatore UV. L'interpretazione dei profili ottenuti viene eseguita secondo i criteri di letteratura (Tenover, 1995)(**Tabella 9**) che consentono di definire i profili dei genomi in analisi come "indistinguibili", "strettamente correlati", "possibilmente correlati" o non correlati, in base al n° di bande differenti.

Categoria	Numero delle differenze genetiche rispetto al ceppo epidemico	Tipico numero delle differenze di frammento rispetto al ceppo epidemico	Interpretazione epidemiologica
Indistinguibili	0	0	L'isolato fa parte del ceppo epidemico
Strettamente correlati	1	2-3	L'isolato fa probabilmente parte del ceppo epidemico
Possibilmente correlati	2	4-6	L'isolato fa possibilmente parte del ceppo epidemico
Differenti	≥ 3	≥ 7	L'isolato non fa parte del ceppo epidemico

Tabella 9. Criteri di interpretazione dei profili PFGE (Tenover, 1995).

2.5 Sequenziamento

Il sequenziamento è una tecnica che consente di risalire alla sequenza di basi che compongono un determinato segmento di DNA (Goodwin, 2016).

I ceppi sono stati sequenziati mediante una tecnologia di *Next Generations Sequencing* (NGS) usando lo strumento *Oxford Nanopore MinION Mk1B*. La tecnologia Nanopore si basa sull'uso di nanopori inseriti in una membrana elettro-resistente, attraversata da una corrente ionica. Quando una molecola di acido nucleico (DNA o RNA) passa attraverso il poro, si produce una specifica alterazione del flusso di corrente in base ai nucleotidi presenti nel poro. Un software di basecalling converte la variazione di corrente nella relativa sequenza nucleotidica. La procedura non necessita dell'amplificazione di DNA ma solo di un estratto di qualità e della preparazione di una libreria.

2.5.1 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA viene eseguita mediante il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich), secondo la procedura descritta in precedenza (2.4.1).

2.5.2 Valutazione quantitativa del DNA

La quantificazione del DNA ottenuto avviene mediante il fluorimetro Qubit 4 (Invitrogen) che permette di ottenere una rapida e sensibile quantificazione di acidi nucleici (DNA, RNA) e delle proteine. Lo strumento esegue la lettura e fornisce una misura della quantità di DNA presente nel campione in ng/µl.

2.5.3 Valutazione qualitativa del DNA

In seguito all'estrazione e alla quantificazione del DNA bisogna verificare che il DNA non sia eccessivamente frammentato e quindi di ottima qualità. La qualità dell'estrazione viene valutata mediante una corsa elettroforetica sul gel d'agarosio all'1 % e con la visualizzazione del gel al transilluminatore UV. La qualità del DNA viene determinata osservando l'impronta che questo lascia nel gel durante la corsa elettroforetica; una banda continua e diffusa, denominata "Smear", indica un elevato grado di frammentazione e di conseguenza la scarsa qualità del campione di DNA. Al contrario la presenza di una banda netta nella parte alta del gel indica un campione di buona qualità.

2.5.4 Assemblaggio ed analisi delle sequenze

Le *reads* ottenute vengono assemblate mediante Canu v 1.9 e successivamente sottoposte ad un processo di *polishing* tramite Medaka v 1.7.3. Le sequenze vengono successivamente analizzate mediante software online per l'analisi bioinformatica, come *ResFinder, MSLT, PlasmidFinder* e *CSIPhylogeny*, disponibili sul sito *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (https://www.genomicepidemiology.org).

3. RISULTATI

3.1 Sensibilità agli antibiotici

La sensibilità a diverse classi di antibiotici (β-lattamici, fluorochinoloni, aminoglicosidi e polimixine) è stata valutata mediante le procedure di diffusione in agar e di microdiluizione in brodo. I risultati sono stati interpretati in base ai valori di *breakpoint* di riferimento EUCAST (EUCAST v_12.0_Breakpoint Tables). I valori di MIC ed il resistotipo risultante dei ceppi in esame sono riportati di seguito nella **Tabella 10**.

Ceppo	mCIM	MIC											
		IMI	MER	ETP	ATM	CAZ	FEP	CZA	FDC	CIP	GEN	AK	COL
ECC10	Pos	4	> 16	1	> 16	> 64	> 32	> 16	1	≤ 0.125	2	2	1
ECC11	Pos	4	16	1	> 16	> 16	> 16	> 16	2	≤ 0.125	≤ 1	2	2
ECC12	Pos	16	16	16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	2	≤ 1	1	2
ECC13	Pos	> 16	> 16	16	≤ 1	> 16	> 16	> 16	1	1	1	1	2
ECC14	Pos	> 16	> 16	16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	1	1	1	2
Kpn1	Pos	8	16	> 16	> 16	> 32	> 16	> 16	1	0.06	0.25	2	2
Kpn2	Pos	8	16	> 16	> 16	> 32	> 16	> 16	1	0.06	0.25	2	2
Kpn3	Pos	> 16	16	> 16	> 16	> 32	> 16	> 16	0.5	0.03	0.5	2	1
Kpn4	Pos	8	8	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	0.5	1	0.5	2	1
Kpn5	Pos	16	16	8	> 16	> 16	> 16	> 16	0.5	0.03	0.5	2	1

Legenda: **R** **S** **NS**

Tabella 10. Resistotipo dei ceppi in esame.

Dalla tabella si può notare come tutti i ceppi siano risultati positivi alla tecnica mCIM ad indicare un'attività carbapenemasica, difatti sono risultati resistenti a tutti i carbapenemi testati: *Imipenem* (IMI), *Meropenem* (MER) ed *Ertapenem* (ETP) (con valori di MIC variabili, range 1 - >16 μg/ml). Tutti i ceppi sono resistenti all'*Aztreonam* (ATM) ad eccezione del ceppo ECC 13.

È presente una marcata resistenza, in tutti i ceppi, alle cefalosporine di terza (*Ceftazidime*, CAZ) e quarta generazione (*Cefepime*, FEP); mentre per le cefalosporine di quinta generazione (*Cefiderocol*, FDC) la quasi totalità risulta sensibile e solamente due ceppi (ECC 12, ECC 14) risultano resistenti (MIC >16 μg/ml). Per quanto riguarda i fluorochinoloni, la maggior parte dei ceppi risulta sensibile a *Ciprofloxacina* (CIP) con un range di MIC ≤ 0,125- 0,03 μg/ml, eccetto i ceppi ECC 12, ECC 13, ECC 14 e Kpn 4 che mostrano un basso livello di resistenza (MIC 1-2 μg/ml). Infine, la totalità dei ceppi in esame risulta sensibile agli aminoglicosidi [*Gentamicina* (GEN), *Amikacina* (AK)] ed alla *Colistina* (COL).

3.2 Tipizzazione molecolare

Applicando le tecniche di PCR, PCR multiplex e del sequenziamento precedentemente descritte sono stati ottenuti i seguenti risultati, riportati nella **Tabella 11a** per la specie ECC e nella **Tabella 11b** per la specie Kpn.

Ceppo	Geni di resistenza	PlasmidF	ResF	ST
ECC10	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFII/FIB(pECLA); IncR; Col(pHAD28)	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14	286
ECC11	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFII/FIB(pECLA); IncR; Col(pHAD28)	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14	286
ECC12	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFII/FIB(pECLA); IncR; Col(pHAD28)	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14; **qnrA1**	286
ECC13	VIM	**IncN**; IncFII/FIB(pECLA); repA(pENTd4a); Col(pHAD28)	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; aadA1; catB2; qacE; sul1; mph(A); **qnrS1**	45
ECC14	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(pHCM2); Col(pHAD28)	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14; **qnrA1**	62

Tabella 11a. Geni di resistenza dei ceppi ECC individuati con PCR e PCR multiplex, plasmidi, geni di resistenza e Sequence Type individuati in seguito a sequenziamento.

In base ai risultati ottenuti con le tecniche di PCR e PCR multiplex si evince che la resistenza ai carbapenemi è dovuta all'espressione del gene *bla*VIM. Inoltre, tutti i ceppi sono positivi per il gene *bla*SHV-12 con l'unica eccezione del ceppo ECC 13; il dato genetico è concorde con il dato di suscettibilità *all'Aztreonam*, in quanto questo antibiotico non rientra nello spettro di attività della carbapenemasi VIM.

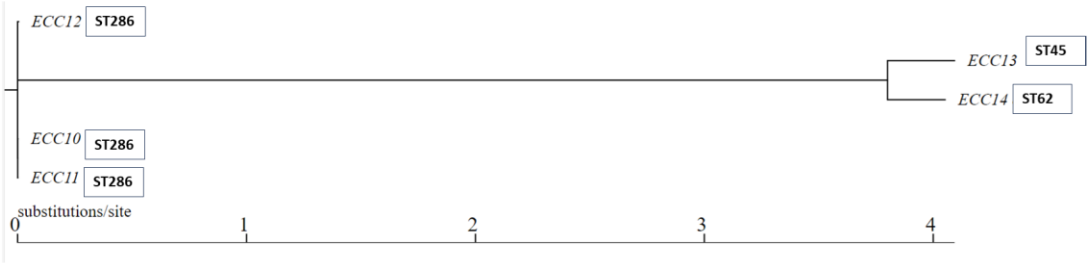
L'analisi delle sequenze mediante *PlasmidFinder* permette una tipizzazione del contenuto plasmidico, consentendo di individuare il numero dei repliconi e identificare i plasmidi in gruppi Inc di incompatibilità. In base ai dati riportati in **Tabella 11a**, e considerando anche i dati ottenuti mediante *ResFinder*, si evidenzia che il gene *bla*VIM è contenuto in un plasmide di gruppo IncA di circa 200 kb in tutti i ceppi in esame, ad eccezione del ceppo ECC 13, in cui è portato da un plasmide IncN (~ 40 kb). Tutti i ceppi condividono un plasmide IncFII/FIB(pECLA), ad eccezione di ECC 14 che contiene un replicon differente IncFIB(pHCM2). I ceppi ECC 10, ECC 11 ed ECC 12 condividono un ulteriore plasmide IncR. Il ceppo ECC 13 presenta un plasmide repA(pENTd4a). Infine, il plasmide Col(pHAD28) è presente in tutti i ceppi in esame, ma date le sue dimensioni molecolari (circa 5 kb) non è stato mai rilevabile mediante la tecnica S1-PFGE.

Mediante l'utilizzo del programma *ResFinder* sono stati confermati tutti i geni di resistenza, precedentemente rilevati con l'analisi PCR, ed individuati ulteriori geni di resistenza presenti nei differenti plasmidi dei ceppi in esame (**Tabella 11a**).

I plasmidi IncA dei ceppi ECC 12 ed ECC 14 contengono un gene di resistenza addizionale, *qnrA1*, mentre ECC 13 ha un gene analogo, *qnrS1*, nel plasmide IncN. Entrambi i due geni conferiscono un basso livello di resistenza ai fluorochinoloni come dimostrato dai valori di MIC alla *Ciprofloxacina* dei tre ceppi. Complessivamente, il plasmide IncA contiene da 9 a 10 geni di resistenza agli antibiotici e un cluster genico per la resistenza ai metalli pesanti (mercurio).

Dalla tabella si può notare che i primi tre isolati (ECC 10, ECC 11 ed ECC 13) appartengono allo stesso Sequence Type, ST286, mentre gli altri due ceppi hanno Sequence Type differenti e non correlati al precedente. Il Sequence Type è stato elaborato mediante l'utilizzo del programma *MLST.*

La correlazione tra i diversi ceppi ECC e la distanza filogenetica è stata analizzata mediante il programma *CSIPhylogeny*. Il dendrogramma e l'analisi dei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) è riportata nella ***Figura 3*** sottostante.



	ECC 10	ECC 11	ECC 12	ECC 13	ECC 14
ECC 10	0	29	335	53940	53628
ECC 11	29	0	326	53947	53633
ECC 12	335	326	0	54101	53804
ECC 13	53940	53947	54101	0	20535
ECC 14	53628	53633	53804	20535	0
min: 29 max: 54101					

Figura 3. Illustrazione ed interpretazione mediante il programma *CSIPhylogeny.*

I tre ceppi ST286 rappresentano quindi un singolo clone (range SNP, 29-335) mentre gli altri due ceppi (ST45 e ST62) sono distanti filogeneticamente tra loro e molto distanti dal clone ST286.

La **Tabella 11b** sottostante riporta i risultati ottenuti per i cinque ceppi di *K. pneumoniae*.

Ceppo	Geni di resistenza	PlasmidF	ResF	ST
Kpn1	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(K); IncFIB(pKPHS1)	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; SHV-12; mph(A); dfrA14	1777
Kpn2	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(K); IncFIB(pKPHS1)	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; SHV-12; mph(A); dfrA14	1777
Kpn3	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(K); pXuzhou21	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14	39
Kpn4	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(K)(pCAV1099-114)	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14; **qnrA1**	464
Kpn5	VIM; SHV-12;	**IncA**; IncFIB(K); IncFII(K)	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14	17

Tabella 11b. Geni di resistenza dei ceppi Kpn individuati con PCR e PCR multiplex, plasmidi, geni di resistenza e Sequence Type individuati con programmi in seguito a sequenziamento.

La positività per i geni *bla*VIM e *bla*SHV-12, evidenziata mediante le tecniche di PCR e PCR multiplex, è stata confermata dalle analisi delle sequenze mediante *ResFinder*. La combinazione di questi due geni conferisce la piena resistenza ai carbapenemi testati (IMI, MER ed ETP) ed all'*Aztreonam*. I geni *bla*VIM e *bla*SHV-12 sono veicolati, in tutti i ceppi, da un plasmide IncA di circa 200 kb come si evince dalle analisi utilizzando il programma *PlasmidFinder*. Tutti i ceppi condividono, nello stesso plasmide, altri geni di resistenza (**Tabella 11b**); il ceppo Kpn 4 presenta il gene *qnrA1* addizionale, analogamente ai due ceppi ECC12 e ECC14.

Infine, relativamente alla tipizzazione mediante MLST, i primi due ceppi, Kpn 1 e Kpn 2, hanno lo stesso Sequence Type 1777, mentre gli altri ceppi Kpn 3, Kpn 4 e Kpn 5 appartengono a Sequence Type differenti, rispettivamente 39, 464 e 17.

Considerando insieme i risultati di sequenziamento di tutti i ceppi VIM-produttori è stato possibile estrapolare l'organizzazione dell'elemento genetico che caratteristicamente veicola *bla*VIM, l'integrone di classe 1 (Poirel, 2011). Ad eccezione del solo ECC13, in cui l'integrone contiene un gene addizionale [APH(3')-XV] ed è portato da un plasmide IncN, in tutti gli altri ceppi l'elemento genetico è portato dal plasmide IncA ed è costituito dalla stessa configurazione e successione genica a partire dal gene di Integrasi [*intI1*, *bla*VIM-1; *aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1*] (***Figura 4***).

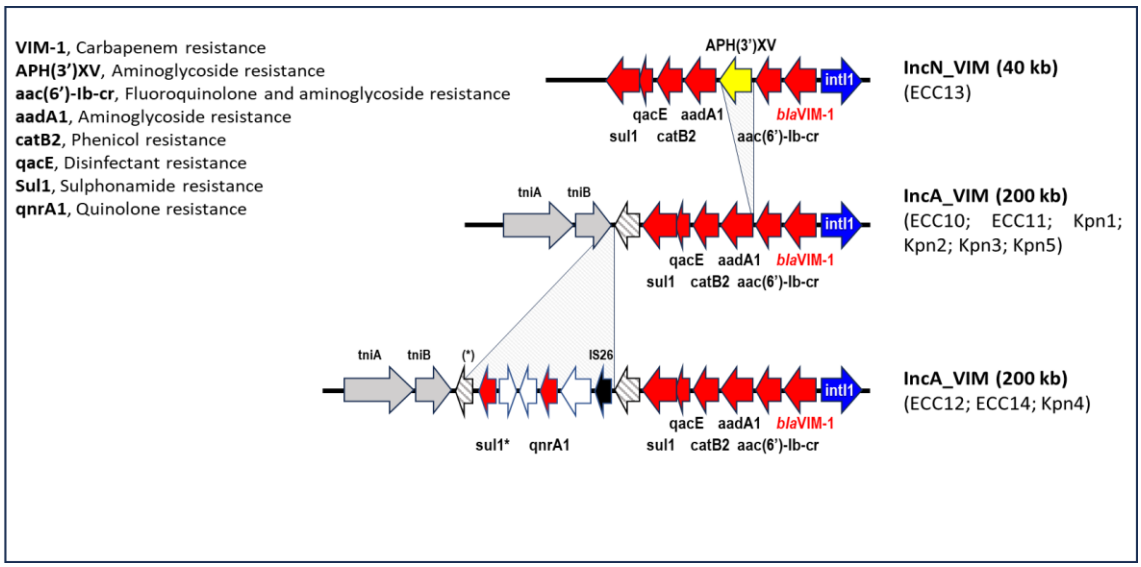
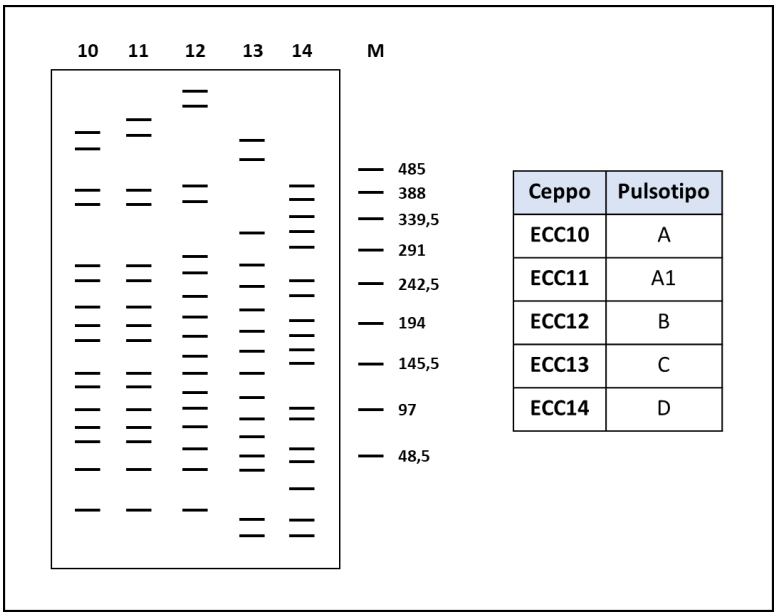


Figura 4. Mappa fisica di *bla*VIM-1 e dell'integrone di classe 1 dei ceppi in esame.

Considerando che tutti i ceppi in esame (con la sola eccezione di ECC13) condividono un medesimo plasmide IncA, che porta l'integrone di classe 1, è stata condotta un'ulteriore indagine per determinare il grado di similarità del plasmide, utilizzando il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Le analisi di sequenza dei 10 ceppi in esame hanno portato a stabilire che tutti gli isolati hanno un'identità nucleotidica superiore al 99 %; in particolare sono stati presi due ceppi come esempio, ECC 13 e Kpn 3 che presentano un'identità pari a 99,98 %.

3.3 Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE

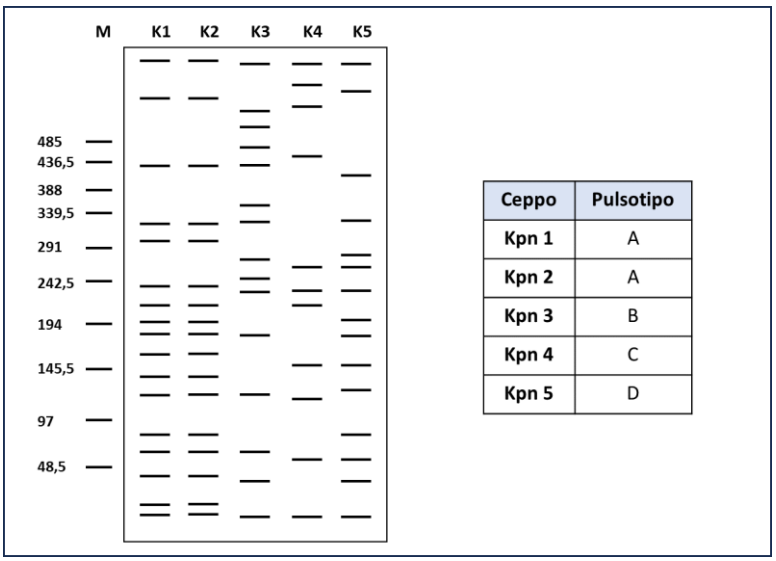
I profili dei ceppi in esame ottenuti mediante l'analisi XbaI-PFGE e la relativa interpretazione dei risultati sono riportati in ***Figura 5a,*** per la specie ECC ed in ***Figura 5b*** per la specie Kpn.



Ceppo	Pulsotipo
ECC10	A
ECC11	A1
ECC12	B
ECC13	C
ECC14	D

Figura 5a. Risultati XbaI-PFGE dei ceppi di *E. cloacae* complex [IncA, VIM-1].

Dalla figura si evince come il primo ed il secondo ceppo, ECC 10 ed ECC 11, hanno pulsotipo strettamente correlato A-A1, essendo i due profili XbaI differenti solo per due bande; gli ultimi tre invece, ECC 12, ECC 13 ed ECC 14, hanno pulsotipi completamente differenti (B-C-D), ad indicare che si tratta di ceppi non correlati.



Ceppo	Pulsotipo
Kpn 1	A
Kpn 2	A
Kpn 3	B
Kpn 4	C
Kpn 5	D

Figura 5b. Profili XbaI-PFGE dei ceppi di *K. pneumoniae* [IncA, VIM-1].

Dalla figura si evince come i primi due ceppi, Kpn 1 e Kpn 2, abbiano il medesimo pulsotipo A; al contrario Kpn 3, Kpn 4 e Kpn 5, hanno pulsotipi differenti (B-C-D) ad indicare il fatto che non sono correlati.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di stabilire che la totalità dei ceppi in esame (ECC 10, ECC 11, ECC 12, ECC 13, ECC 14, Kpn 1, Kpn 2, Kpn 3, Kpn 4 e Kpn 5) risulta resistente ai carbapenemi grazie alla presenza del gene *bla*VIM, che codifica per un enzima metallo β-lattamasi. Il gene *bla*VIM è localizzato in un integrone di classe 1 che contiene altri geni di resistenza contigui ed è portato da plasmidi coniugativi. Tutti i ceppi, ad eccezione di ECC 13, sono resistenti all'*Aztreonam* per l'espressione del gene *bla*SHV-12, che codifica per ESBL in grado di idrolizzare il substrato monobattamico. Tale gene è portato dagli stessi plasmidi di resistenza VIM, ma non è situato all'interno dell'integrone di classe 1.

Il 40 % dei ceppi presenta una resistenza ai fluorochinoloni grazie alla presenza dei geni *qnrA1* (ECC 12, ECC 14 e Kpn 4) e *qnrS1* (ECC 13). Il 20 % dei ceppi (ECC 12 ed ECC 14) risulta resistente anche ad una delle ultime cefalosporine immesse in commercio (quinta generazione), il *Cefiderocol* (FDC); difatti la resistenza alle altre cefalosporine testate (terza e quarta generazione) dipende dall'espressione di VIM e SHV.

Attraverso l'indagine molecolare, condotta mediante sequenziamento Nanopore ed analisi con programmi dedicati (https://www.genomicepidemiology.org), è stato possibile conoscere in dettaglio il resistoma ed il contenuto plasmidico di tutti i ceppi. Da queste analisi è emerso che tutti i ceppi in esame presentano il plasmide IncA ad eccezione del ceppo ECC 13 che presenta IncN. In entrambi i plasmidi è presente l'integrone di classe 1 che porta il gene *bla*VIM.

I risultati ottenuti sono concordi con quelli presenti in letteratura. Entrambi i plasmidi IncA e IncN identificati nei nostri ceppi sono riportati come elementi associati con la diffusione di *bla*VIM in ceppi appartenenti a specie di *Enterobacterales* diverse (Arcari 2020, Marchetti 2021). Tuttavia, si osservano delle differenze nel contenuto di geni di resistenza. A differenza del ceppo *E. cloacae Sequence Type*, ST 382 (Marchetti, 2021), il plasmide IncN di ECC 13 (ST 45) contiene il gene APH(3')-XV all'interno dell'integrone di classe 1 e presenta il gene *mph*(A), mentre non ha il gene *dfrA14*. Differente è anche il plasmide IncA identificato in *E. kobei* (ST 54) nella letteratura di riferimento (Marchetti, 2021) rispetto ai ceppi analizzati nel nostro studio. In *E. kobei* il plasmide IncA (circa 165) contiene geni addizionali quali: *aac(6')-Ib3, arr-3, catB3*, inoltre presenta il gene *qnrS2* ed il gene *bla*OXA-1, mentre nei ceppi in esame è presente il gene *bla*SHV-12 che risulta mancante nel ceppo di riferimento.

Viceversa, il plasmide IncA (circa 200 kb), condiviso da tutti gli altri ECC e dai cinque ceppi di *K. pneumoniae* (con una identità nucleotidica > 99%) ha un'organizzazione ed una sequenza di geni di resistenza concorde con pAC_VIM di un isolato di *K. pneumoniae* (circa 156 kb) (Arcari, 2020); oltre alle minori dimensioni pAC_VIM presenta all'interno dell'integrone il gene APH(3')-XV, che invece risulta mancante in tutti i ceppi in esame.

Considerando inoltre sia i dati di letteratura che i risultati ottenuti in questo studio è possibile affermare che la resistenza ai carbapenemi, mediata dal gene *bla*VIM, è legata alla diffusione di plasmidi di coniugazione diversi che sono disseminati da diverse specie *Enterobacterales*. Inoltre, non sembra esserci una relazione clonale sia tra i ceppi del nostro studio, sia con quelli riportati in letteratura.

4.1 Conclusioni

I nostri risultati sono concordi con quanto osservato in altri ceppi *Enterobacterales* produttori di VIM in Italia. In particolare, nel serbatoio di analisi (Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche) durante il periodo 2021-23, è stata osservata una incidenza lievemente aumentata di ceppi VIM-produttori. Tale fenomeno potrebbe essere stato favorito dalla disseminazione di *bla*VIM attraverso plasmidi di gruppo IncA. Come riportato in precedenza (Arcari, 2020) i plasmidi IncA combinano sia una maggiore efficienza di coniugazione sia un aumentato spettro d'ospite, rispetto ad IncN, che normalmente è diffuso solo all'interno degli enterobatteri.

I nostri risultati indicano l'importanza di condurre studi di analisi molecolare per individuare il tipo di carbapenemasi, che può essere cruciale sia nella gestione terapeutica delle infezioni, sia per comprendere la circolazione dei plasmidi in diversi ambienti.

5. BIBLIOGRAFIA

- Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. Antibiotics. 2019;8(2). doi:10.3390/antibiotics8020037

- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473- 3099(17)30753-3

- Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(4). doi:10.1128/CMR.00002- 19

- Emeraud Cécile, Caroline Petit1, Lauraine Gauthier1, Rémy A. Bonnin, Thierry Naas and Laurent Dortet. Emergence of VIM-producing 78 Enterobacter cloacae complex in France between 2015 and 2018. J Antimicrob Chemother. 2022 Mar 31;77(4):944-951. doi: 10.1093/jac/dkab471.

- Gabriele Arcari, Federica Maria Di Lella, Giulia Bibbolino, Fabio Mengoni, Marzia Beccaccioli, Guido Antonelli, Luigi Faino, Alessandra Carattoli. A Multispecies Cluster of VIM-1 Carbapenemase-Producing Enterobacterales Linked by a Novel, Highly Conjugative, and Broad-Host-Range IncA Plasmid Forebodes the Reemergence of VIM-1. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64(4):e02435-19. doi: 10.1128/AAC.02435-19.

- Mattoni Marchetti V, Ibrahim Bitar, Mario Sarti , Elena Fogato , Erika Scaltriti , Chiara Bracci , Jaroslav Hrabak , Stefano Pongolini, Roberta Migliavacca. Genomic Characterization of VIM and MCR CoProducers: The First Two Clinical Cases, in Italy. Diagnostics (Basel). 2021;11(1):79. doi: 10.3390/diagnostics11010079.

- Di Pilato V, Errico G, Monaco M et al. The changing epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. J. Antimicrob. Chemother. 76(2), 355–361 (2021).

- Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 55, 2321– 2333 (2017).

- https://eucast.org

- EUCAST v_12.0_Breakpoint Tables

- Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

- 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. doi:10.1016/j. diagmicrobio.2010.12.002.

- 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 β-lactamases in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(3):490-495. doi:10.1093/jac/dkp498

- www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf

- Tenover FC, Arbeit RD, Goering R, et al. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Vol 33.; 1995.

- Goodwin Sara, John DMc Pherson, W Richard McCombie. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics. 2016; 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.

- https://www.genomicepidemiology.org

- https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi