



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

INDAGINE SULLA INCIDENZA DI
ENTEROBACTERIACEAE RESISTENTI AI
CARBAPENEMI NELLA FILIERA
SUINICOLA DELLA REGIONE MARCHE

INVESTIGATION ON THE INCIDENCE
OF CARBAPENEM RESISTANT
ENTEROBACTERIACEAE IN THE
SWINE CHAIN OF MARCHE REGION

TESI SPERIMENTALE

Studente:
ALESSIO GIAMPIERI

Relatore:
DOTT.SSA CRISTIANA GAROFALO

Correlatori:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ
PROF.SSA CARLA VIGNAROLI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	3
ELENCO DELLE FIGURE	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	5
1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	6
1.1 Gli antibiotici	6
1.1.1 Definizione e cenni storici	6
1.1.2 Gli antibiotici Carbapenemi	8
1.2 L'antibiotico-resistenza.....	10
1.2.1 Principali meccanismi di resistenza agli antibiotici.....	10
1.2.2 Resistenza ai Carbapenemi: le carbapenemasi.....	14
1.3 Agricoltura e resistenza ai Carbapenemi	16
1.3.1 Principali serbatoi ambientali di Carbapeneme-resistenza	16
1.3.2 Serbatoi agricoli di Carbapeneme-resistenza.....	19
1.4 Scopo della tesi	24
2. MATERIALI E METODI	26
2.1 Campionamento	26
2.2 La preparazione dei substrati di crescita	27
2.2.1 Terreno MacConkey Agar	27
2.2.2 Terreno LB.....	29
2.2.3 Acqua peptonata	29
2.2.4 Terreno MHII Broth.....	29
2.2.5 Terreno MH Agar	30
2.3 Le conte vitali in piastra.....	32
2.4 Arricchimento ed isolamento delle <i>Enterobacteriaceae</i> Carbapeneme-resistenti	33
2.5 Test di Hodge e determinazione della Concentrazione Minima Inibente	35
2.6 L'estrazione del DNA microbico	40
2.7 La quantificazione del DNA microbico mediante spettrofotometro	41

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	42
3.1. Enumerazione di <i>Enterobacteriaceae</i>	42
3.2. Risultati del Test di Hodge e della determinazione della MIC	46
3.3. La quantificazione del DNA mediante spettrofotometro	47
4. CONCLUSIONE	49
5. RINGRAZIAMENTI	50
6. BIBLIOGRAFIA.....	51

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 Elenco dei campioni analizzati	26
Tabella 2 Composizione del terreno MacConkey Agar	27
Tabella 3 Composizione del terreno Luria-Bertani.....	29
Tabella 4 Composizione terreno Mueller Hinton II.....	29
Tabella 5 Composizione terreno Mueller Hinton Agar.....	30
Tabella 6 Risultati delle conte vitali in piastra espressi in log UFC/g	42
Tabella 7 Risultati del Test di Hodge modificato e della determinazione della Concentrazione Minima Inibente ($\mu\text{g/mL}$) degli isolati fenotipicamente resistenti.....	46
Tabella 8 Risultati della quantificazione del DNA mediante spettrofotometro	47

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 Struttura base dei Carbapenemi	8
Figura 2 Mappa delle principali identificazioni, in vari serbatoi ambientali, di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi	22
Figura 3 Principali meccanismi di contaminazione dei corsi d'acqua da parte delle Enterobacteriaceae resistenti ai Carbapenemi.....	23
Figura 4 Piastre Petri con MacConkey Agar e con MacConkey Agar + ertapenem.....	28
Figura 5 Schema di analisi	31
Figura 6 Individuazione e selezione delle colonie morfologicamente diverse.....	34
Figura 7 Strisci in coltura pura delle colonie selezionate.....	34
Figura 8 Test di Hodge Modificato: schema.....	36
Figura 9 Test per la determinazione della Concentrazione Minima Inibente: schema	39
Figura 10 Pellet da omogenati per l'estrazione di DNA microbico totale	40
Figura 11 Risultati della enumerazione di Enterobacteriaceae espresse in log UFC/g.....	43

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ABS	Assorbanza
AR	Antibiotico-resistenza
CPE	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
CRE	Carbapeneme-resistant <i>Enterobacteriaceae</i>
D3A	Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (UNIVPM)
DiSVA	Dipartimento di Scienze della Vita e dell' Ambiente (UNIVPM)
EUCAST	Comitato Europeo per i Test di Suscettibilità Antimicrobica
IMP	Imipenemasi
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasi
MHT	Modified Hodge Test
MR	multi-resistente
NAM	acido N-acetilmuramico
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
OXA	Carbapenem-hydrolysing oxacillinase
PCR	reazione a catena della polimerasi
PBP	Penicilin Binding Protein
UFC	Unità Formanti Colonia
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

1.1 Gli antibiotici

1.1.1 Definizione e cenni storici

Gli Antibiotici, dal greco anti (contro) e bíōsis (vita), sono sostanze che vengono prodotte naturalmente da alcune classi di funghi e batteri, o che possono essere sintetizzate artificialmente (chemio-antibiotici), che interferiscono con lo sviluppo dei batteri causandone la morte o inibendone la moltiplicazione. Il loro effetto sui microrganismi può essere, infatti, batteriostatico, nel caso in cui la riproduzione del batterio venga impedita, o battericida se ne provocano la morte diretta.

Questi composti possiedono una tossicità selettiva, risultando dannosi per i batteri, ma non per le cellule eucariotiche, poiché agiscono su bersagli assenti in queste ultime o meno essenziali di quanto non lo siano per il metabolismo e la vita microbica. Gli antibiotici possiedono inoltre un elevato indice terapeutico per cui quote di principio attivo non tossiche per l'ospite si rivelano invece letali per il patogeno. Per tali motivi questa classe di farmaci è ampiamente utilizzata in medicina per prevenire o curare infezioni batteriche (Garattini, 2020).

Nel 1895 Vincenzo Tiberio, medico assistente presso l'Università di Napoli, pubblicò un saggio dal titolo "Sugli estratti di alcune muffe", dove venivano esposti i suoi studi sull'effetto battericida di alcuni funghi nei confronti di batteri agenti causali di infezioni intestinali, anticipando così la scoperta degli antibiotici (Tamburello & Villone, 2016). Trentaquattro anni dopo, il medico scozzese Alexander Fleming notò accidentalmente l'effetto d'inibizione batterica causato dalla muffa *Penicillium chrysogenum* in una coltura su piastra Petri di stafilococchi. Venne così isolata la prima molecola di Penicillina, metabolita con attività antibiotica, che successivamente, dal 1941, fu prodotta su scala industriale, contribuendo in modo decisivo al trattamento delle infezioni batteriche sui soldati statunitensi della Seconda Guerra Mondiale. Dopo la Penicillina vennero scoperti molti altri antibiotici naturali, composti di riferimento per la preparazione di antibiotici semisintetici, che oggi rappresentano i principali farmaci a disposizione per il trattamento delle infezioni batteriche.

Gli antibiotici, in virtù del notevole numero di molecole che con il progredire della ricerca sono state rese disponibili ed utilizzabili, possono essere raggruppati e classificati in svariati modi.

La divisione per tipo di azione prevede una distinzione tra antibiotici batteriostatici e battericidi, mentre quella secondo lo spettro di azione li raggruppa a seconda di uno spettro d'azione ampio, attivi sia verso batteri Gram positivi che quelli negativi, o ristretto, con attività esclusiva verso uno solo dei due tipi batterici. Ancora, gli antibiotici possono essere suddivisi in funzione della loro carica elettrica in acidi, basici o neutri, o distinguendo la loro struttura chimica e raggruppandoli, in funzione di essa, in classi; le principali classi sono: Amminoglicosidi, Beta-lattamici (che comprendono come sottoclassi Cefalosporine, Carbapenemi, Monobattami e Penicilline), Fluorochinoloni, Glicopeptidi, Macrolidi, Ossazolidinoni, Polipeptidici, Rifamicine, Sulfamidici, Streptogramine e Tetraciline (Garattini, 2020).

Queste molecole, per impedire la moltiplicazione o uccidere direttamente il microrganismo, hanno differenti meccanismi d'azione, agendo, a seconda dell'antibiotico, con le seguenti modalità:

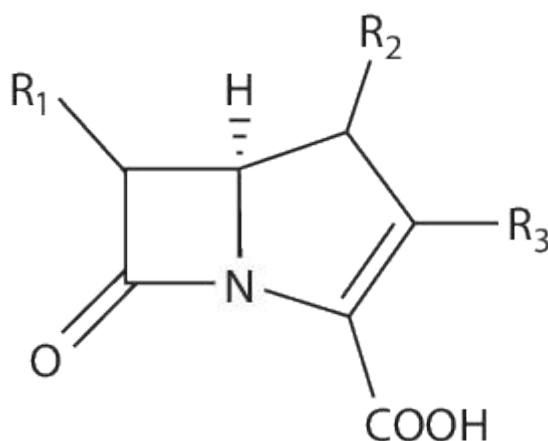
- inibizione della sintesi della parete cellulare;
- inibizione della sintesi proteica, a livello della subunità 50S o 30S dei ribosomi;
- inibizione della replicazione e trascrizione degli acidi nucleici, con azione sugli enzimi RNA-polimerasi o DNA-girasi;
- alterazione della membrana citoplasmatica;
- azione anti-metabolica.

1.1.2 Gli antibiotici Carbapenemi

I Carbapenemi (*Figura 1*) sono antibiotici utilizzati in medicina umana nel trattamento di infezioni, in pazienti ospedalieri, causate da batteri Gram negativi che presentano Antibiotico-resistenza (AR). Questi composti sono, infatti, ad ampio spettro: attivi nei confronti dei batteri Gram negativi e di alcuni batteri Gram positivi e anaerobi (EFSA , 2013).

Figura 1 Struttura base dei Carbapenemi

(Manik & Wen-Jun, 2015)



Tali antibiotici appartengono alla classe dei beta-lattamici, che comprende un gruppo esteso di molecole aventi in comune la presenza di un anello tetratomico (un'amide ciclica) centrale, chiamato nucleo beta-lattamico, il quale, oltre a dare il nome alla classe, rappresenta il farmacoforo di questi antibiotici.

L'anello beta-lattamico, infatti, essendo a quattro termini, raro nei composti presenti in natura, è dotato di un'energia significativamente elevata, che trova spiegazione attraverso la teoria della tensione angolare di Baeyer. Gli atomi di carbonio, essendo ibridizzati sp^3 , devono ridurre, in questa molecola, il valore ideale dei loro angoli, che dovrebbe invece essere di 109 gradi e 5 primi. Se uno dei legami tra carboni, dunque, si rompe, l'anello si apre e i legami riprendono la loro geometria tetraedrica preferita, formando un composto aperto molto più stabile. L'apertura dell'anello è possibile grazie alla presenza di un'accentuata elettrofilia dell'atomo di carbonio ammidico, che lo rende suscettibile ad attacchi nucleofili che avvengono ad opera del residuo serinico presente nelle transpeptidasi batteriche (Klein, 2016).

I beta-lattamici, infatti, sono in grado di attraversare le porine, agendo poi sulle Penicilin Binding Protein (PBPs), enzimi serino-dipendenti che intervengono nella fase di sintesi del peptidoglicano, struttura essenziale della parete batterica.

Il peptidoglicano, costituente che dona rigidità e protezione alla parete, è un polisaccaride formato da unità ripetute di glicantetrapeptide, struttura fondamentale composta da due amminozuccheri, N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), uniti da un legame beta 1-4 glucosidico, ed una corta catena tetra-peptidica che parte a livello del gruppo lattato del NAM. Gli amminoacidi (Aa) della catena si collegano ad Aa di catene diverse attraverso legami crociati mediante un legame peptidico diretto nei Gram negativi o ponti peptidici nei Gram positivi (Madigan et al., 2016).

I legami crociati sono formati, nell'ultima fase di sintesi del peptidoglicano, per mezzo della catalisi dell'enzima transpeptidasi (una PBP) nel cui sito attivo si possono inserire i beta-lattamici, che lo inattivano ed impediscono, in ultima analisi, la sintesi completa della parete cellulare batterica, indebolendo la struttura e causando la morte del batterio per lisi osmotica.

I Carbapenemi, pur presentando il gruppo tipico della classe, si distinguono dagli altri beta-lattamici, quali Monobattami, Penicilline e Cefalosporine, per la presenza di un anello pentatomico pirrolidinico (2,3-diidro-1Hpirrolo) fuso al beta-lattame. A differenza di quanto accade nelle Penicilline, questo anello presenta un'insaturazione tra i carboni in posizione 1 e 2, mentre sono assenti atomi di zolfo. Il primo composto trovato con questa caratteristica, l'acido olivamico, fu isolato nel 1976 dai prodotti di fermentazione di varie specie batteriche appartenenti al genere *Streptomyces*, attinomiceti Gram positivi aerobi; il primo antibiotico ad essere isolato fu invece la Tienamicina (Wallace et al., 2011). Quest'ultima, oltre a rappresentare il modello della classe, venne utilizzata per la produzione di derivati più stabili poiché instabile in soluzioni acquose. Nel tempo furono isolati altri Carbapenemi quali Imipenem, Meropenem, Ertapenem e Doripenem.

Questi antibiotici rappresentano oggi una delle soluzioni che possono essere adottate nel trattamento di infezioni causate da batteri multi-resistenti (MR), nei confronti dei quali altri antibiotici falliscono: i Carbapenemi sono, infatti, resistenti a molte beta-lattamasi batteriche, responsabili quest'ultime dell'idrolisi di altri beta-lattamici. L'acquisizione da parte dei batteri, di resistenza anche nei confronti dei Carbapenemi, riduce quindi il ventaglio di terapie utilizzabili in questi casi, rappresentando così un rischio per la Salute Pubblica. Al fine di evitare un rapido sviluppo e una successiva diffusione di geni resistenti a questi antibiotici l'utilizzo in medicina animale è stato quindi vietato (Bonardi & Pitino, 2019).

1.2 L'antibiotico-resistenza

1.2.1 Principali meccanismi di resistenza agli antibiotici

Nel 1945, durante il suo discorso per il premio Nobel, Alexander Fleming sottolineò che i batteri avrebbero potuto sviluppare AR, fatto confermato nel 1947 isolando alcuni ceppi batterici resistenti alla Penicillina (Clementi & Aquilanti, 2011). L'AR rappresenta oggi un problema di notevole rilievo per la salute umana: nell'anno 2007 l'Europa registra 25000 decessi causati da infezioni ospedaliere ad opera di batteri MR, con danni economici globali che si sono ripercossi, quell'anno, sulla Comunità Europea, stimati intorno gli 1,5 bilioni di euro (European Centre for Disease Prevention and Control and the European Medicines Agency, 2009).

L'AR è un fenomeno biologico trasmissibile che consente ai batteri di sopravvivere e moltiplicarsi anche se sottoposti a trattamenti antibiotici. Questa può essere una caratteristica presente naturalmente nel batterio o acquisita. Nel primo caso si parla di resistenza naturale o intrinseca, in cui un determinato microrganismo non risulta mai essere stato sensibile ad uno specifico antibiotico; questo tipo di AR si traduce in uno spettro d'azione più o meno ampio dell'antibiotico stesso. La resistenza acquisita, invece, è il risultato di mutazioni del genoma batterico, su cui poi agisce la selezione, o dello scambio di geni tra diversi ceppi o specie, che determinano l'inefficacia di un antibiotico prima attivo contro la stessa specie batterica.

Vi sono vari meccanismi per i quali un batterio può essere insensibile ad un antibiotico, nel caso della resistenza naturale questi sono principalmente due:

- assenza del target bersaglio dell'antibiotico: per esempio i batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* non sono sensibili al Triclosan, antibatterico a largo spettro, grazie alla naturale presenza di un allele che codifica per un enzima (enoil ACP reductasi) strutturalmente differente da quello che si riscontra nelle altre specie batteriche e che normalmente è riconosciuto dall'antibatterico;
- impermeabilità della parete batterica all'antibiotico: alcuni antibiotici, come i Lincosamidi, riescono a penetrare efficacemente solo nei batteri Gram positivi, mentre sono pressoché inutilizzabili nei confronti dei batteri Gram negativi in virtù della composizione della loro parete batterica, che risulta essere naturalmente meno permeabile.

Nel caso di resistenza acquisita, invece, sono coinvolti quattro meccanismi principali:

- riduzione della concentrazione intracellulare dell'antibiotico per diminuzione della permeabilità della parete batterica o per meccanismi di efflusso: essendo la parete batterica dei Gram negativi poco permeabile, alcuni antibiotici sono costretti a penetrare attraverso porine non specifiche. La presenza di alcune mutazioni può portare ad alleli codificanti per una ridotta espressione delle porine o per porine specifiche che impediscono l'ingresso dell'antibiotico, o ancora alcuni batteri possono acquisire geni di sovra-espressione delle pompe di efflusso, che sono attive nell'espulsione degli antibiotici;
- modifica del target biologico riconosciuto dall'antibiotico per mutazione diretta o modifica post-traduzionale: i bersagli degli antibiotici sono codificati da geni che possono subire mutazioni, rendendoli insensibili all'azione dell'antibiotico; in alternativa possono essere acquisiti geni che codificano per molecole in grado di legarsi al bersaglio così da proteggerlo dall'attacco dell'antibiotico;
- modifica della via biochimica in cui è presente il bersaglio dell'antibiotico: alcuni batteri possono acquisire nuove vie biochimiche per raggiungere la produzione dello stesso metabolita;
- inattivazione per produzione di enzimi in grado di inattivare l'antibiotico per idrolisi o attraverso la sua modifica: la produzione di enzimi idrolitici, che hanno la capacità di degradare la molecola antibiotica, rappresenta oggi il meccanismo di resistenza più diffuso e preoccupante, in quanto i batteri possono acquisire più geni codificanti per enzimi attivi verso antibiotici diversi, contribuendo alla formazione di ceppi batterici MR (Blair et al., 2015).

In ogni caso l'AR è l'espressione di un'informazione genetica propria del microrganismo che nei batteri, è contenuta nel cromosoma (più spesso costituito da un singolo elemento di DNA circolare a doppio filamento) e negli eventuali plasmidi (generalmente piccole molecole di DNA circolare a doppio filamento che contengono pochi geni e sono presenti in numero variabile, replicandosi in modo indipendente dal cromosoma). A differenza dei geni presenti nel cromosoma, quelli che si trovano nei plasmidi codificano per informazioni non essenziali per la cellula (corredo genetico aggiuntivo), ma che possono conferire, in certe condizioni o ambienti, un vantaggio selettivo (Madigan et al., 2016).

Nei procarioti le informazioni genetiche possono essere trasferite verticalmente (mediante riproduzione asessuata) o orizzontalmente. La trasmissione verticale riguarda plasmidi e cromosomi che vengono duplicati (i plasmidi possono essere replicati anche in molteplici copie) e ripartiti durante la scissione binaria alle due cellule figlie: in questo caso l'AR, acquisita o intrinseca, viene mantenuta da quello stesso ceppo batterico, trasferendosi alla sola progenie.

Nel caso di trasmissione orizzontale, invece, frammenti di DNA oppure interi plasmidi vengono trasferiti tra organismi non correlati, non solo tra differenti ceppi ma anche tra diverse specie batteriche. Questo tipo di trasmissione rappresenta una minaccia ancora più significativa in virtù del fatto che i geni di AR non solo si possono diffondere tra diversi ceppi di microrganismi patogeni e non, ma anche perché in questo modo può avvenire una diffusione simultanea di geni codificanti per meccanismi di resistenza nei confronti di differenti classi antibiotiche anche non correlate, contribuendo così allo sviluppo di batteri MR (Antonelli et al., 2019).

I meccanismi di scambio genetico ad oggi conosciuti che consentono il passaggio di geni tra microrganismi non correlati sono la trasformazione, la trasduzione e la coniugazione. In tutti i casi il trasferimento avviene in un'unica direzione: dal microrganismo donatore al ricevente (Madigan et al., 2016).

La trasformazione è la capacità di un batterio di assumere DNA dall'ambiente, integrarlo nel proprio genoma, e decodificarlo. Questa è determinata geneticamente, ma per essere espressa occorrono, generalmente, specifiche condizioni ambientali come l'alterazione delle condizioni di crescita, una riduzione o un eccesso di nutrienti o un aumento della densità cellulare (quorum sensing). Quando ciò si realizza, la cellula, per un determinato periodo temporale, diventa *competente*, iniziando a produrre proteine che consentono l'acquisizione del frammento di DNA, quali proteine di membrana in grado di legarlo, un'autolisina e varie endonucleasi. In condizioni naturali solo l'1% dei batteri sono trasformabili, ma alcuni di questi sono microrganismi patogeni per l'uomo, come alcuni batteri appartenenti ai generi *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Thomas & Nielsen, 2005). La cellula competente necessita di DNA extracellulare, libero nell'ambiente, per poter effettuare il processo di trasformazione. Alcuni generi batterici sono capaci di rilasciare attivamente il DNA nell'ambiente. In ogni caso il materiale genetico viene normalmente liberato in modo passivo, in seguito alla decomposizione cellulare e all'autolisi batterica, processo autoindotto in caso di danni cellulari, o causato dal sistema immunitario dell'ospite o dall'esposizione ad agenti antibiotici.

Il primo evento durante la trasformazione è la formazione di un legame tra la proteina di membrana della cellula ricevente e il frammento di DNA libero. Durante l'acquisizione il DNA può essere ulteriormente frammentato e una volta nel citoplasma viene protetto da proteine specifiche che impediscono l'attacco delle nucleasi citoplasmatiche, fino al raggiungimento del cromosoma. A questo punto una speciale proteina (RecA) permette il posizionamento e la ricombinazione del frammento con regioni omologhe del cromosoma batterico; la cellula sarà così trasformata. Se il frammento acquisito codifica per geni di AR il batterio ricevente diverrà a sua volta resistente e avrà un vantaggio selettivo che si tradurrà in una fitness maggiore.

Un secondo meccanismo di trasferimento genetico orizzontale è la trasduzione: processo di integrazione di DNA, appartenente ad un'altra cellula batterica, mediato da un batteriofago. I virus sono parassiti endocellulari obbligati, in grado di replicarsi solo all'interno di cellule viventi. I batteriofagi sono particolari virus in grado di infettare esclusivamente i batteri. La replicazione di queste entità può avvenire attraverso due meccanismi: ciclo litico e ciclo lisogeno.

Il primo processo replicativo si compone delle fasi di attacco (adsorbimento) e penetrazione, replicazione del materiale genetico e sua trascrizione, assemblaggio dei costituenti virali, ed infine lisi della cellula ospite. Un virus che esegue questo ciclo viene definito *virulento*. I virus che effettuano un ciclo lisogeno (*virus temperati*), invece, integrano il proprio materiale genetico con il DNA del cromosoma batterico (*profago*), duplicandosi con esso. Se le condizioni ambientali subiscono una variazione il profago può staccarsi dal cromosoma batterico, diventando DNA fagico, ed effettuare un ciclo litico. Durante quest'ultimo ciclo, errori nel meccanismo replicativo del batteriofago possono, in alcuni casi, portare ad inglobare nella particella virale una porzione di genoma batterico, che durante il successivo ciclo lisogeno verrà trasferito al nuovo ospite. Anche in questo caso il frammento di DNA trasferito può portare all'acquisizione di AR da parte della cellula ospite.

La coniugazione batterica è un processo di trasferimento genetico che, rispetto ai due precedenti, riguarda in maniera più specifica i plasmidi. Il meccanismo, per poter avvenire necessita, infatti, del contatto tra una cellula donatrice dotata di un plasmide coniugativo (detto *fattore F*) e di una cellula ricevente che ne è priva. Nei Gram negativi il contatto è mediato da un pilo sessuale che è codificato dal plasmide stesso. Il plasmide si duplica secondo la modalità di replicazione a cerchio rotante e una copia rimane nella cellula donatrice, mentre l'altra è trasferita nella ricevente, che a sua volta può comportarsi come cellula donatrice e contribuire alla diffusione del plasmide.

Oltre ai plasmidi coniugativi, durante il trasferimento, possono essere trasferiti anche altri elementi genetici. Il fattore F può infatti comportarsi da *episoma*, integrandosi nel cromosoma batterico e quindi trasferire, durante la coniugazione, l'intero cromosoma o, in caso di danni nella fase di coniugazione, parte dei geni in esso contenuto. Inoltre, alcuni plasmidi sono mobilizzabili e quando sono presenti nella cellula insieme a plasmidi coniugativi, possono anch'essi essere trasmessi con un meccanismo di coniugazione. Tra questi i *plasmidi R* che contengono geni di resistenza agli antibiotici (Madigan et al., 2016).

1.2.2 Resistenza ai Carbapenemi: le carbapenemasi

Così come per gli altri antibiotici, anche nei confronti dei Carbapenemi i batteri possono presentare o sviluppare antibiotico-resistenza (AR). Nei Gram-negativi, batteri contro i quali vengono utilizzati i Carbapenemi, negli ultimi anni si sta riscontrando un incremento della resistenza, specialmente nei generi *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, batteri non fermentanti, e nelle *Enterobacteriaceae* (Guerra et al., 2014).

Le *Enterobacteriaceae*, in particolare, sono una famiglia di batteri anaerobi facoltativi ubiquitari, il cui habitat naturale è rappresentato dall'intestino dell'uomo e di altri animali, ma che si trovano anche in molti altri ambienti. Gli enterobatteri possono comportarsi da commensali nei confronti dell'uomo, ma alcuni di essi sono dei microrganismi patogeni ed altri possono causare infezioni opportunistiche in individui debilitati.

Le *Enterobacteriaceae* resistenti ai Carbapenemi (Carbapeneme-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) rappresentano oggi un problema clinico rilevante in caso di infezioni nosocomiali, in quanto le opzioni terapeutiche risultano limitate ed occorre quindi ricorrere a combinazioni di antibiotici e farmaci alternativi, spesso più tossici per l'uomo, considerando anche il fatto che tale resistenza è spesso associata ad altre AR. Le CRE, inoltre, a causa dell'elevata capacità di diffusione tra i pazienti e dell'attitudine alla trasmissione orizzontale degli elementi genetici mobili codificanti per questa AR, destano preoccupazione per la Salute Pubblica.

Nel caso dei Carbapenemi, la resistenza intrinseca è determinata da caratteristiche innate quali una ridotta permeabilità della membrana, per riduzione delle porine aspecifiche, una bassa affinità delle PBPs e la presenza di pompe di efflusso in alcune specie batteriche. La resistenza acquisita è causata, invece, dall'assimilazione di materiale genetico esogeno codificante per la produzione di carbapenemasi (EFSA, 2013).

Le carbapenemasi sono particolari beta-lattamasi, enzimi in grado di idrolizzare i beta-lattamici. Queste conferiscono ai batteri una resistenza non solo nei confronti di un vasto spettro di antibiotici beta-lattamici come Penicilline, Cefalosporine e Monobattamici, ma, a differenza di altre beta-lattamasi, conferiscono resistenza anche nei confronti dei Carbapenemi, classe di farmaci considerata come una delle poche classi di antibiotici utilizzabili nei confronti di batteri multiresistenti. Le carbapenemasi possono essere distinte in base alla classificazione su base strutturale di Ambler, che le suddivide in quattro classi: A, B, C, D. Le molecole appartenenti alla classe B (Metallo- β -lattamasi) si differenziano dalle altre perché presentano uno o due atomi di zinco nel sito attivo che utilizzano come co-fattore per idrolizzare il beta-lattamico, a differenza delle altre β -lattamasi che si avvalgono di un residuo di serina (Serina β -lattamasi) nel sito attivo per l'idrolisi dell'antibiotico. Le classi A, C, D si distinguono tra loro in base al grado di omologia delle rispettive catene polipeptidiche (Sawa et al., 2020).

Le carbapenemasi più importanti dal punto di vista epidemiologico sono:

- VIM (Verona Integron-encoded Metallo-beta-lattamasi), isolata nel 1997 da un gruppo di ricercatori italiani;
- IMP (Imipenemasi), la prima carbapenemasi ad essere stata individuata nel 1991 in Giappone;
- NDM (New Delhi Metallo-beta-lattamasi), isolata per la prima volta in India nel 2008;
- KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase), identificata nel 1996 negli USA;
- OXA (Carbapeneme-hydrolysing Oxacillinase), scoperta per la prima volta nel 2003, in Turchia (Meletis, 2016);

Le prime tre sono metallo-beta-lattamasi, appartenenti alla classe B, mentre le carbapenemasi KPC e OXA appartengono rispettivamente alla classe A e D. La maggior parte di queste famiglie di enzimi sono codificate da elementi genetici mobili collocati su cromosomi o su plasmidi (Patel & Bonomo, 2013).

1.3 Agricoltura e resistenza ai Carbapenemi

1.3.1 Principali serbatoi ambientali di Carbapeneme-resistenza

Le prime carbapenemasi furono ritrovate negli anni '90, ma fino all'inizio del millennio successivo le segnalazioni furono rare e isolate. A partire dagli anni 2000, invece, l'isolamento di microrganismi produttori di questi enzimi in differenti serbatoi ambientali sono divenute sempre più frequenti (Bonardi & Pitino, 2019).

Il principale serbatoio di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (CPE) è rappresentato dagli ospedali. Qui i Carbapenemi sono impiegati nel trattamento di infezioni nosocomiali causate da batteri Gram-negativi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro. In questi luoghi vi è quindi un'esposizione diretta dei microrganismi al farmaco e una conseguente selezione dei ceppi resistenti. Lo studio e la ricerca delle CPE sono così prevalentemente focalizzati in ambito clinico (Ray et al., 2016). Poiché le *Enterobacteriaceae* fanno normalmente parte, nell'apparato digerente umano della microflora commensale, quest'ultima, se acquisisce geni di resistenza agli antibiotici, interviene nella disseminazione dei cloni resistenti selezionati. All'interno dell'ospedale, ad esempio, un veicolo classico di AR sono le mani, che possono essere facilmente contaminate se si entra a contatto con pazienti infetti (Caniça et al., 2015). Negli individui asintomatici, non sottoposti a specifiche analisi, le CRE possono poi rimanere silenti fin quando non si verificano infezioni (Kelly et al., 2017).

In Cina, uno studio effettuato tra il 2014 e il 2015 ha isolato 999 batteri resistenti ai Carbapenemi ottenuti da infezioni nosocomiali su pazienti ricoverati in ospedali situati in 27 differenti regioni cinesi. Questi isolati appartenevano ai patogeni opportunisti *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, ed *Enterobacter* spp., mentre i geni correlati a questa resistenza erano *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (Zhang et al., 2017).

Anche in Europa la presenza di CRE negli ospedali desta preoccupazione. Nell'area di Bolzano (Nord Italia), specie diverse di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi VIM sono state isolate tra il 2005 e il 2012, rivelando una presenza di CRE che, seppur contenuta, era da ritenersi endemica (Aschbacher et al., 2008; Aschbacher et al., 2011). Tra il 2011 e il 2012, uno studio effettuato nel distretto ospedaliero della città, considerando un campione di popolazione locale formato da 23.000 individui, ha isolato complessivamente 28 CRE. La ricerca, mediante PCR, dei principali geni implicati nella produzione di carbapenemasi, ha confermato la diffusione dei geni *bla_{KPC-3}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM-1}* (Aschbacher et al., 2013). Un altro studio effettuato sempre in Italia, nel 2011, coinvolgendo in questo caso 25 differenti laboratori sparsi in tutto il territorio nazionale, è stato condotto su ceppi di *Enterobacteriaceae* implicate in infezioni ospedaliere. Sui 13.749 isolati il 2% è stato confermato come CRE e la maggior parte dei ceppi apparteneva alla specie *Klebsiella pneumoniae*. Sui 25 laboratori ben 23 hanno rinvenuto almeno un caso di CPE, confermando così che il fenomeno si stava diffondendo in maniera epidemica nell'intera penisola (Giani et al., 2013). La presenza di *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi KPC, oltre che in Italia, è stata segnalata frequentemente anche in Grecia e Romania, mentre è meno diffusa in nord Europa. Il problema associato a *Klebsiella pneumoniae* è rappresentato dal fatto che questa specie batterica mostra ormai resistenza pressoché a tutti i beta-lattamici e molto spesso si osserva anche una co-resistenza nei confronti di altri antibiotici (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Dall'ospedale i ceppi di CRE e i loro geni possono poi passare all'ambiente circostante attraverso le acque reflue. Gli impianti di trattamento delle acque, infatti, eliminano la maggior parte dei batteri e dei composti chimici, ma in alcuni casi non riescono a rimuovere la totalità di questi elementi e possono consentire il passaggio di alcuni geni (Mills & Lee, 2019). In alcuni studi effettuati in Bangladesh e in Svizzera è stato infatti evidenziato che i corsi d'acqua a valle di alcuni ospedali, pur essendo presenti impianti ospedalieri di depurazione delle acque reflue, possono contenere CRE (Islam et al., 2017; Zurfluh et al., 2017). Questi impianti rappresentano il principale mezzo di diffusione di AR nell'ambiente. Una piccola percentuale di batteri può di fatto sopravvivere al trattamento delle acque ospedaliere e si ipotizza che il processo possa addirittura incrementare la diffusione dei geni di AR, in quanto, seppur la popolazione batterica dopo la depurazione venga ridotta drasticamente, la vicinanza tra i batteri durante tutto il processo consente tassi di coniugazione più elevati.

Questo potrebbe incrementare la frazione di batteri aventi geni di AR nella ristretta popolazione che sopravvive al processo (Kelly et al., 2017; Galler et al., 2014).

Una volta raggiunti i corsi d'acqua, i geni di AR, anche se dopo la depurazione sono presenti in concentrazioni trascurabili, sono liberi nell'ambiente e possono raggiungere sedimenti o biofilm presenti nelle acque. I biofilm sono aggregazioni di microrganismi che si trovano aggrappati a rocce o ad altri substrati di diversa natura, dotati di un'elevata capacità assorbente e in grado di assimilare nutrienti e contaminanti. In questi serbatoi stazionari possono avvenire, così, fenomeni di scambio genico orizzontale, con un'efficace diffusione di geni di AR e una moltiplicazione delle CRE (Yang et al., 2017), tanto da essere considerati pericolosissimi *hot-spot* di conservazione di questi geni, con rischi potenziali gravi (Mills & Lee, 2019). In queste condizioni il corso d'acqua risulta contaminato e, a causa dell'elevata mobilità dell'acqua, vi è un rischio potenziale di inquinamento di altri serbatoi.

Gli ospedali, però, non sono l'unico luogo di selezione e distribuzione delle CPE. L'inquinamento dei corsi d'acqua e dell'ambiente, anche se dovuto a sostanze differenti dagli antibiotici, ad esempio, è in grado di determinare la selezione di geni di AR. Alcuni studi hanno dimostrato che negli ambienti molto inquinati possono essere isolati alcuni batteri aventi geni di AR. In una zona industriale alpina altamente inquinata da idrocarburi petroliferi sono stati trovati batteri Gram-negativi che, oltre a rivelarsi MR, avevano sviluppato la capacità di produrre sostanze antimicrobiche, in grado di effettuare così una pressione selettiva su altri microrganismi (Caniça et al., 2015).

Inoltre, un settore chiave che influisce significativamente nella propagazione di AR è l'agricoltura. Medicina ed agricoltura sono infatti le due attività che fanno più largo impiego di antibiotici: negli allevamenti vengono utilizzati alcuni antibiotici per prevenire e curare le infezioni batteriche e, nonostante l'utilizzo di Carbapenemi sia vietato in medicina animale, questo non impedisce il ritrovamento di CRE nei serbatoi ambientali connessi al mondo agricolo (Kelly et al., 2017). Lo studio e il controllo delle filiere agroalimentari risultano, per questo, essere fondamentali (EFSA, 2013).

1.3.2 *Serbatoi agricoli di Carbapeneme-resistenza*

Negli ultimi anni i batteri commensali dell'uomo hanno destato una sempre maggiore preoccupazione, in quanto possono rappresentare una riserva di geni di AR che potrebbero poi essere trasferiti ai microrganismi patogeni. Precisamente, la filiera agroalimentare è considerata la via principale per l'introduzione, nel tratto gastrointestinale umano, di alimenti di natura animale o vegetale contaminati da batteri AR. Per questo il controllo dei processi produttivi degli alimenti risulta essenziale (Clementi & Aquilanti, 2011).

Alcune tecniche agricole potrebbero risultare un efficace mezzo di diffusione di geni di AR. Ad esempio, l'irrigazione delle colture agrarie, associata all'utilizzo di acque provenienti da corsi inquinati o non adeguatamente depurati, è in grado di diffondere nell'ambiente batteri e geni implicati in fenomeni di AR, trasferendo questi ultimi alle comunità microbiche presenti nel suolo e nelle superfici vegetali (Caniça et al., 2015).

L'agricoltura, però, non svolge esclusivamente un ruolo di diffusione, ma potrebbe esercitare una vera e propria pressione selettiva positiva nei confronti dei batteri AR. Con l'avvento degli antibiotici il loro utilizzo si è diffuso, infatti, in modo esponenziale, ed inizialmente questi composti sono stati impiegati anche per scopi non terapeutici, come la promozione della crescita e la prevenzione di patologie batteriche nel bestiame, o la protezione delle colture agricole. Come conseguenza, i batteri in possesso di geni di AR hanno acquisito un vantaggio selettivo e si è assistito al successivo incremento del numero di ceppi che presentavano resistenza, in correlazione anche al fatto che la selezione ha agito promuovendo quei ceppi che erano in grado di compiere il trasferimento genico orizzontale di questi geni (Clementi & Aquilanti, 2011). Oggi l'utilizzo di antibiotici come promotori di crescita in Europa è vietato, ma molteplici classi di antibiotici, oltre che in medicina umana, trovano impiego nel comparto veterinario per fini terapeutici, includendo gli allevamenti per la produzione alimentare e l'acquacoltura (Anadòn, 2006).

Inoltre, non solo la zootecnia, ma anche la stessa produzione vegetale può essere oggi coinvolta nel rilascio dei residui antibiotici nell'ambiente (Kelly et al., 2017). Alcuni biocidi o additivi contenuti in certi formulati utilizzati per la difesa delle colture agrarie, sono infatti costituiti da molecole analoghe ad alcuni composti antimicrobici, o che svolgono un ruolo di pressione selettiva per geni di resistenza implicati anche in fenomeni di AR o che si trovano sugli stessi plasmidi (Caniça et al., 2015). Anche il letame, fertilizzante impiegato in agricoltura, potrebbe contenere tracce di alcuni residui di antibiotici utilizzati in zootecnia, se proveniente da allevamenti in cui sono presenti animali trattati.

In questo modo le comunità batteriche nei campi agricoli sono sottoposte a selezione per geni di AR a causa dell'esposizione diretta delle nicchie batteriche con questi composti (Kelly et al., 2017). Attraverso il *run off*, sia i residui antibiotici che i batteri resistenti possono così contaminare i territori a valle e arrivare ai corsi d'acqua, inquinando altri serbatoi ambientali. Oltre a questo, anche gli insetti presenti negli allevamenti possono comportarsi da vettori di batteri (Bonardi & Pitino, 2019).

Nel caso più specifico dei Carbapenemi, al fine di preservare la loro efficacia nell'uomo, è vietato il loro utilizzo in medicina veterinaria, anche a fini terapeutici (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Tuttavia, CRE sono state ugualmente ritrovate negli allevamenti. Il ritrovamento di questi microrganismi potrebbe essere attribuito all'utilizzo di cefalosporine ad ampio spettro negli allevamenti, le quali sono invece autorizzate. L'esatta relazione non è ancora stata stabilita anche se è noto che la pressione selettiva determinata da uno specifico antibiotico può indurre resistenza ad altri composti della stessa classe, o che appartengono a classi diverse, ma che condividono lo stesso bersaglio (Clementi & Aquilanti, 2011).

In particolare, in alcune CRE sono stati ritrovati plasmidi che contengono contemporaneamente geni di resistenza ai Carbapenemi e alle cefalosporine di terza generazione (per es. *bla_{VIM-1}* e *bla_{ACC-1}*). Inoltre, la somministrazione delle cefalosporine è comunemente riportata quando si riscontrano microrganismi Carbapeneme-resistenti negli allevamenti, per cui si ipotizza che la presenza di geni di AR potrebbe essere favorita da una concentrazione minima di cefalosporine (Bonardi & Pitino, 2019).

Questa correlazione venne individuata a partire dal primo isolamento di CRE nella filiera suinicola. Nel 2011, infatti, nel corso di uno studio in Germania in un allevamento di suini si isolarono da animali sani CPE appartenenti alla specie *Escherichia coli*, che è una specie commensale anche degli animali. I ceppi mostravano una resistenza nei confronti di Penicillina, Cefamicina, Amoxicillina, Acido Clavulanico e dei Carbapenemi (imipenem, ertapenem, meropenem). L'analisi mediante PCR individuò i geni *bla_{VIM-1}* e *bla_{ACC-1}* (Fischer et al., 2012). Sempre in Germania, l'anno successivo, un altro monitoraggio effettuato in due allevamenti suinicoli e uno avicolo, rivelò la presenza di CPE con gli stessi geni di AR. Questo ritrovamento, però, fu più allarmante, in quanto i batteri appartenevano alla specie *Salmonella infantis*, uno dei cinque agenti patogeni responsabili di salmonellosi in Europa, caratterizzata da setticemia e morte.

Inoltre, analisi comparate hanno rivelato che in queste *Enterobacteriaceae* il plasmide portatore del gene codificante per la VIM era *IncHI2*, plasmide che presentava un'elevata omologia nei confronti di quelli ritrovati in alcuni isolati di origine ospedaliera.

I plasmidi trovati nei ceppi di *E. coli* segnalati nello studio precedente, invece, presentavano una delezione rispetto a quelli di salmonella: questo dimostrò la possibilità di una selezione evolutiva dei microrganismi nei serbatoi agricoli (Fischer et al., 2017). Nel 2015, altri studi volti a monitorare il fenomeno confermarono la persistenza delle carbapenemasi negli allevamenti tedeschi, mentre anche negli allevamenti belga vennero riscontrati batteri produttori di VIM (Garcia-Graells et al., 2020).

Ancora, in USA uno studio effettuato in un allevamento suinicolo ha individuato una correlazione tra la somministrazione di Cefalosporine ai suinetti nel periodo di vita tra la nascita e la castrazione, che avviene nella prima settimana di vita, e l'aumento della frazione di CRE nelle feci. In questo caso il gene implicato è risultato essere *bla_{IMP-27}* (Mollenkopf et al., 2017).

Per quanto riguarda l'allevamento avicolo, nel 2016, uno studio condotto in Egitto nella filiera di produzione del pollo da carne, rilevò che su 100 campioni prelevati da organi, feci e acqua d'abbeveraggio, il 35% presentava batteri appartenenti alla specie *Klebsiella pneumoniae*, e di questi il 15% era dotato di geni di resistenza ai Carbapenemi.

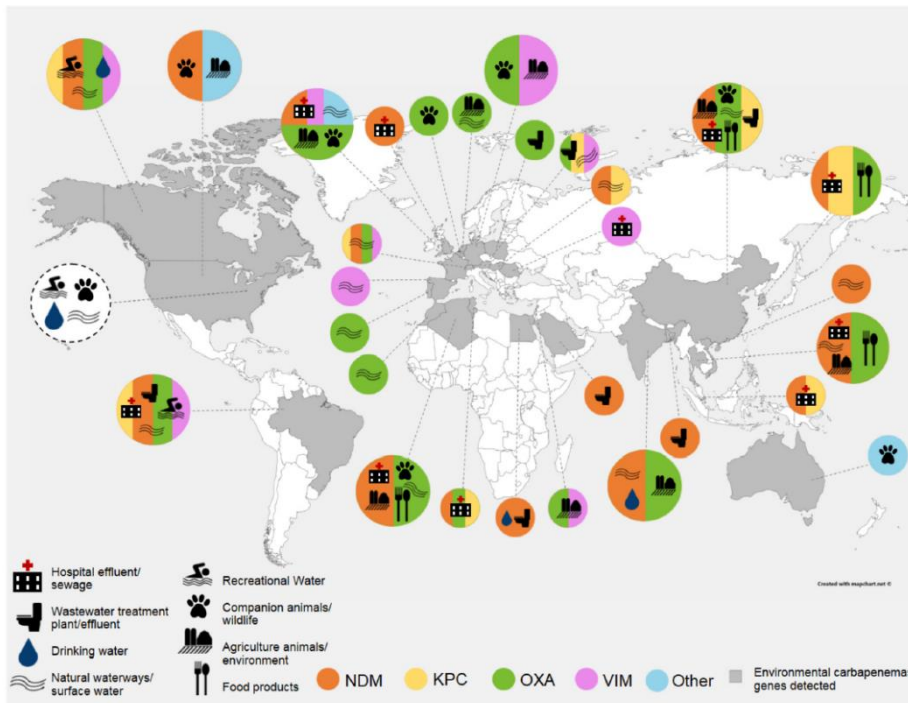
Questo ha confermato di fatto il ruolo del settore alimentare quale possibile fonte di contaminazione da parte di geni di Carbapeneme-resistenza, oltre che a destare allarme in quanto *Klebsiella pneumoniae* rappresenta negli avicoli uno dei patogeni respiratori più pericolosi, responsabili di un'elevata mortalità negli allevamenti, e nell'uomo può causare infezioni respiratorie e del tratto urinario (Hamza et al., 2016).

In Cina un monitoraggio effettuato prelevando campioni di feci e latte crudo da vacche affette da mastite ha dimostrato la presenza di CPE, in possesso del gene *bla_{NDM-5}*, responsabile della resistenza, ad ampio spettro, ai Carbapenemi e ad altri antibiotici. Questo studio ha sottolineato che la diffusione delle CRE negli allevamenti si sta verificando in molti continenti. Inoltre, evidenzia la possibile correlazione tra l'utilizzo dei beta-lattamici non carbapenemici quali amoxicillina (una Penicillina) e ceftiofur (una Cefalosporina), normalmente impiegati nel trattamento delle mastiti in questi allevamenti, e la loro pressione selettiva che si esprime anche nei confronti di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi (He et al., 2017).

Da questi e altri studi emerge che gli allevamenti possono rappresentare importanti serbatoi di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi (Figura 2). In sintesi, le CRE si riscontrano maggiormente nelle filiere avicole (in Algeria, Bangladesh, Cina, Egitto, Germania, India, Libano, Spagna, Regno Unito e Stati Uniti), suinicole (Cina, Germania, India, Italia, Romania e Regno Unito) e bovine (in Algeria, Cina, Egitto, India ed Inghilterra) (Köck et al., 2018).

Figura 2 Mappa delle principali identificazioni, in vari serbatoi ambientali, di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi

(Mills & Lee 2019)



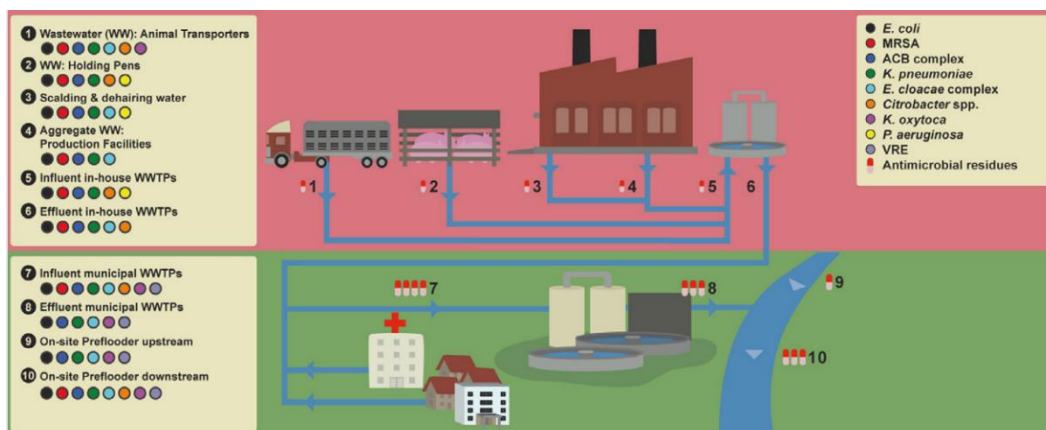
Attraverso il commercio internazionale dei prodotti agroalimentari, il fenomeno potrebbe poi amplificarsi, con la diffusione delle CRE in altri stati e continenti (Caniça et al., 2015). Il commercio di insetti per fini alimentari, ad esempio, può svolgere un ruolo chiave nella espansione, tra differenti stati, delle CRE. L'utilizzo di insetti nell'alimentazione umana è molto diffuso nel mondo, mentre in Europa, seppur il commercio sia stato regolamentato, rappresenta ancora un cibo innovativo, ritenuto però valido dal punto di vista nutrizionale e ambientale, in quanto gli insetti sono facili da allevare e producono meno gas serra rispetto agli animali tradizionalmente allevati.

Da uno studio effettuato prelevando campioni di insetti edibili appartenenti alle specie *Locusta migratoria* e *Tenebrio molitor*, allevati in Belgio, nei Paesi Bassi e in Thailandia, e acquistati via internet, sono stati ritrovati i geni *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{VIM}*, mettendo così in luce l'importanza del monitoraggio dell'AR anche in queste fonti alimentari (Milanovic' et al., 2018). Il settore agricolo può in questo modo essere considerato un cruciale serbatoio di CRE, le quali possono poi arrivare all'uomo attraverso il contatto diretto o con una contaminazione incrociata dei prodotti alimentari.

Anche nei confronti dei Carbapenemi, però, l'agricoltura può rivelarsi non solo fonte di selezione e diffusione delle CRE, ma anche fattore di contaminazione di altri serbatoi ambientali come i corsi d'acqua (Figura 3). Uno studio effettuato in Germania dimostra, infatti, che le acque di scarico dei macelli, seppur siano sottoposte a trattamenti delle acque reflue all'uscita dal macello e, successivamente, negli impianti municipali, possono essere in egual modo inquinate da CRE. Questo documenta che gli ospedali non sono gli unici serbatoi a dover essere considerati come fonti di contaminazione da parte di batteri Carbapenem-resistenti e sottolinea la necessità di un costante monitoraggio della filiera agroalimentare (Savin et al., 2020).

Figura 3 Principali meccanismi di contaminazione dei corsi d'acqua da parte delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai Carbapenemi

(Savin, 2020)



1.4 Scopo della tesi

Questo studio ha lo scopo di contribuire all'individuazione di eventuali serbatoi di resistenza ai Carbapenemi negli allevamenti suinicoli della regione Marche.

In particolare, la presente Tesi di Laurea si svolge all'interno di un programma di sviluppo rurale (PSR) finanziato dalla regione Marche, per il triennio 2019-2022, dal titolo "Reduction of the use of antibiotics in pig breeding: production and quality effects". Questo progetto ha come scopo finale l'ottenimento della certificazione "Suine Antibiotic Free" (SAF) da parte di aziende suinicole della regione Marche, attraverso la riduzione e in seguito eliminazione dell'impiego degli antibiotici fino a 120 giorni prima della macellazione dei suini. Il progetto, si compone di più fasi quali l'applicazione del protocollo antibiotic-free e successive analisi qualitative, panel test e consumer test sulle carni fresche e trasformate, analisi dell'ambiente di allevamento e, al contempo, controlli analitici, sia negli ambienti di allevamento che negli animali e nelle carni, per determinare l'eventuale presenza di microrganismi resistenti ai Carbapenemi e geni che conferiscono resistenze ai Carbapenemi trasmissibili. In quest'ultimo ambito l'Area di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A) dell'UnivPM si occupa di campionare, mangimi e feci di suino e, nella fase di macellazione, fegato, reni e carne, da 4 piccole e medie aziende suinicole delle Marche. Questi campioni vengono poi analizzati per isolare ceppi di *Enterobacteriaceae* resistenti ai Carbapenemi eventualmente presenti ed estrarre il DNA microbico totale da ciascun campione, al fine di ricercare eventuali geni codificanti per le carbapenemasi più diffuse attraverso tecniche di PCR.

Precisamente, le analisi effettuate nella presente Tesi di Laurea hanno riguardato analisi coltura-dipendenti che prevedevano la enumerazione di *Enterobacteriaceae* da alcuni campioni oggetto dello studio e precisamente: 1 campione di mangime, 5 campioni di feci, 5 di carne, 5 di fegato e 5 di reni prelevati da una azienda marchigiana partner del progetto. In seguito ad arricchimento selettivo, è stato effettuato un isolamento delle colonie di *Enterobacteriaceae* in grado di crescere in presenza di ertapenem, un antibiotico appartenente alla classe dei Carbapenemi. Grazie ad una collaborazione con il gruppo di microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA), gli isolati di *Enterobacteriaceae* presunti resistenti a ertapenem sono stati sottoposti a Test di Hodge e al test per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC: Minimal Inhibitory Concentration), al fine di verificare se alla presunta resistenza, osservata negli isolati, corrispondesse una resistenza effettiva.

Inoltre, in parallelo, è stato estratto il DNA microbico totale dagli omogenati dei campioni analizzati. Il DNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometro e verrà sottoposto a qPCR per la ricerca dei più comuni geni di resistenza ai Carbapenemi.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento

In data 02-03-2021 sono stati prelevati i campioni provenienti da un allevamento di suini della regione Marche. I campioni sono stati ottenuti in seguito alla macellazione di cinque differenti capi suini. Per ogni animale sono stati prelevati un rene e un fegato allo stato integrale, un campione di carne di circa 100 g e, dai box di allevamento di ogni suino, sono state prelevate le feci. Oltre a questo, è stato campionato anche il mangime utilizzato per l'alimentazione di tutti i suini allevati nella struttura.

I campioni, elencati in *Tabella 1*, sono stati prelevati con cucchiari o coltelli sterili e posti in sacchetti o contenitori sterili e sono stati conservati refrigerati fino all'arrivo in laboratorio per le analisi.

Tabella 1 Elenco dei campioni analizzati

CODICE	CAMPIONE	DATA
MS44(1)	Mangime suino	02/03/2021
FS44(2)	Feci suine	02/03/2021
FS44(3)	Feci suine	02/03/2021
FS44(4)	Feci suine	02/03/2021
FS44(5)	Feci suine	02/03/2021
CS44(1)	Carne suina	02/03/2021
CS44(2)	Carne suina	02/03/2021
CS44(3)	Carne suina	02/03/2021
CS44(4)	Carne suina	02/03/2021
CS44(5)	Carne suina	02/03/2021
FES44(1)	Fegato suino	02/03/2021
FES44(2)	Fegato suino	02/03/2021
FES44(3)	Fegato suino	02/03/2021
FES44(4)	Fegato suino	02/03/2021
FES44(5)	Fegato suino	02/03/2021
RE44(1)	Rene suino	02/03/2021
RE44(2)	Rene suino	02/03/2021
RE44(3)	Rene suino	02/03/2021
RE44(4)	Rene suino	02/03/2021
RE44(5)	Rene suino	02/03/2021

2.2 La preparazione dei substrati di crescita

2.2.1 *Terreno MacConkey Agar*

Al fine di isolare i batteri Gram-negativi presenti nei campioni e distinguere, tra questi, i vari gruppi, è stato utilizzato come substrato di crescita agar MacConkey, terreno di coltura solido, selettivo e differenziale. La selettività del terreno è garantita dalla presenza di cristalvioletto e sali biliari: questi permettono la crescita di molti batteri Gram-negativi e in particolare delle *Enterobacteriaceae*, e inibiscono la crescita della maggior parte di batteri Gram-positivi. Al contempo questo substrato è in grado di differenziare le varie colonie che si sviluppano su di esso grazie al rosso neutro, un indicatore di pH che vira al rosso se il pH scende sotto al 6,8. La presenza di lattosio, come unica fonte di zuccheri, permette di evidenziare quelle colonie che lo fermentano anaerobicamente, producendo così metaboliti acidi che abbassano il pH. I batteri che, al contrario, non sono fermentanti formeranno colonie incolori. La quantità di terreno liofilizzato necessaria, a seconda del volume di terreno finale, è stata diluita in acqua in condizioni di sterilità. La soluzione ottenuta è stata successivamente sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti. La composizione del terreno è indicata in *Tabella 2*.

Tabella 2 *Composizione del terreno MacConkey Agar*

Peptone	20,0 g/L
Agar agar	15,0 g/L
Lattosio	10,0 g/L
Cloruro di sodio	5,0 g/L
Sali biliari n°3	1,5 g/L
Rosso neutro	0,03 g/L
Cristalvioletto	0,001 g/L
pH 7,1 ± 0,2 a 25°C	

Al contempo si è preparato altro terreno, seguendo la stessa procedura, al quale è stato però aggiunto ertapenem, antibiotico appartenente alla classe dei Carbapenemi, ottenendo un substrato di crescita come il precedente, ma selettivo nei confronti dei batteri resistenti alla concentrazione di antibiotico presente nel substrato, pari a 0,12 µg/mL.

La soluzione stock di ertapenem è distribuita in fialette da 50 µL, alla concentrazione di 10 mg/mL. Per ottenere il giusto dosaggio, ovvero la corretta concentrazione di ertapenem e il volume necessario, a seconda della quantità di terreno da utilizzare, si è operato in due step successivi:

- si è eseguita una prima diluizione, prelevando 10 µL di soluzione stock, aggiungendola a 990 µl di acqua distillata, ottenendo 1 mL di soluzione antibiotica con una concentrazione di ertapenem pari a 100 µg/mL;
- si è determinato il volume di soluzione antibiotica diluita da inserire nel terreno a seconda del volume di terreno necessario per la semina, applicando l'*Equazione 1*.

Equazione 1 equazione delle diluizioni

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

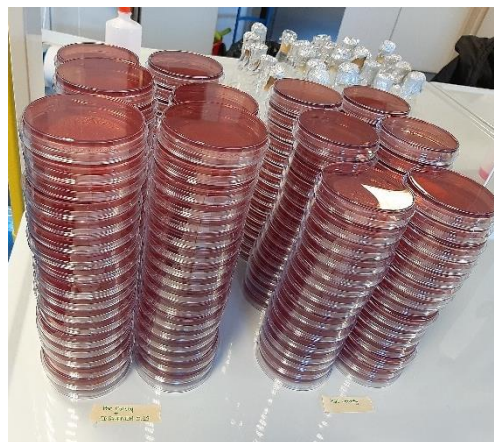
Considerando quindi la concentrazione iniziale di ertapenem (C_1) pari a 100 µg/mL e la concentrazione finale (C_2) da raggiungere pari a 0,12 µg/mL, a seconda del volume di terreno necessario (V_2), si è determinato il volume di soluzione antibiotica da inserire (V_1), risolvendo l'equazione in funzione di quest'ultimo, come mostrato in *Equazione 2*.

Equazione 2 equazione delle diluizioni isolando il volume iniziale

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

Il terreno necessario è stato preparato considerando che se ne versano circa 18 mL per ogni piastra. Poi le piastre sono state lasciate riposare capovolte per evitare che le gocce di condensa potessero inquinare il terreno (*Figura 4*)

Figura 4 Piastre Petri con MacConkey Agar e con MacConkey Agar + ertapenem



2.2.2 Terreno LB

Il terreno Luria-Bertani (LB) è un terreno liquido ricco. Questo è stato preparato in laboratorio, seguendo le dosi e gli ingredienti indicati in *Tabella 3*.

Tabella 3 Composizione del terreno Luria-Bertani

Triptone	10,0 g/L
Cloruro di sodio	10,0 g/L
Estratto di lievito	5,0 g/L
pH $7 \pm 0,2$ a 25°C	

La soluzione è stata successivamente sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti. Questa operazione è stata effettuata anche in ulteriori tubi contenenti, oltre ai 10 mL di LB, ertapenem a concentrazione finale di 0,12 µg/mL, seguendo lo stesso metodo descritto per il MacConkey agar.

2.2.3 Acqua peptonata

L'acqua peptonata è una soluzione isotonica, utilizzata per ottenere gli omogenati iniziali ed eseguire tutte le successive diluizioni decimali seriali. Sono state preparate un numero di beute pari al numero dei campioni, contenenti 90 mL di acqua peptonata. Sono inoltre stati preparati tubi da 10 mL contenenti 9 mL di acqua peptonata. I tubi e le beute sono stati successivamente sterilizzati in autoclave.

2.2.4 Terreno MHII Broth

Il terreno Mueller Hinton II (MHII Broth) è un brodo di coltura che presenta cationi calcio e magnesio aggiunti e viene utilizzato per i test di sensibilità antimicrobica. In particolare, il terreno MHII Broth contiene una concentrazione di Ca^{2+} pari a 20-25 mg/L e di ioni Mg^{2+} pari a 10-12,5 mg/L ed è stato utilizzato come terreno di coltura per la determinazione della MIC. Questo substrato è disponibile in commercio allo stato disidratato. Per l'utilizzo si è proceduto all'aggiunta di acqua deionizzata. La composizione del terreno è indicata in *Tabella 4*.

Tabella 4 Composizione terreno Mueller Hinton II

(Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis)

Idrolizzato acido di caseina	17,5 g/L
Estratto di carne	3,0 g/L
Amido	1,5 g/L
pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C	

2.2.5 Terreno MH Agar

Il terreno Mueller Hinton Agar (MH agar), è stato impiegato per il test di Hodge (*Modified Hodge test*). La sua composizione è indicata in

Tabella 5.

Tabella 5 Composizione terreno Mueller Hinton Agar

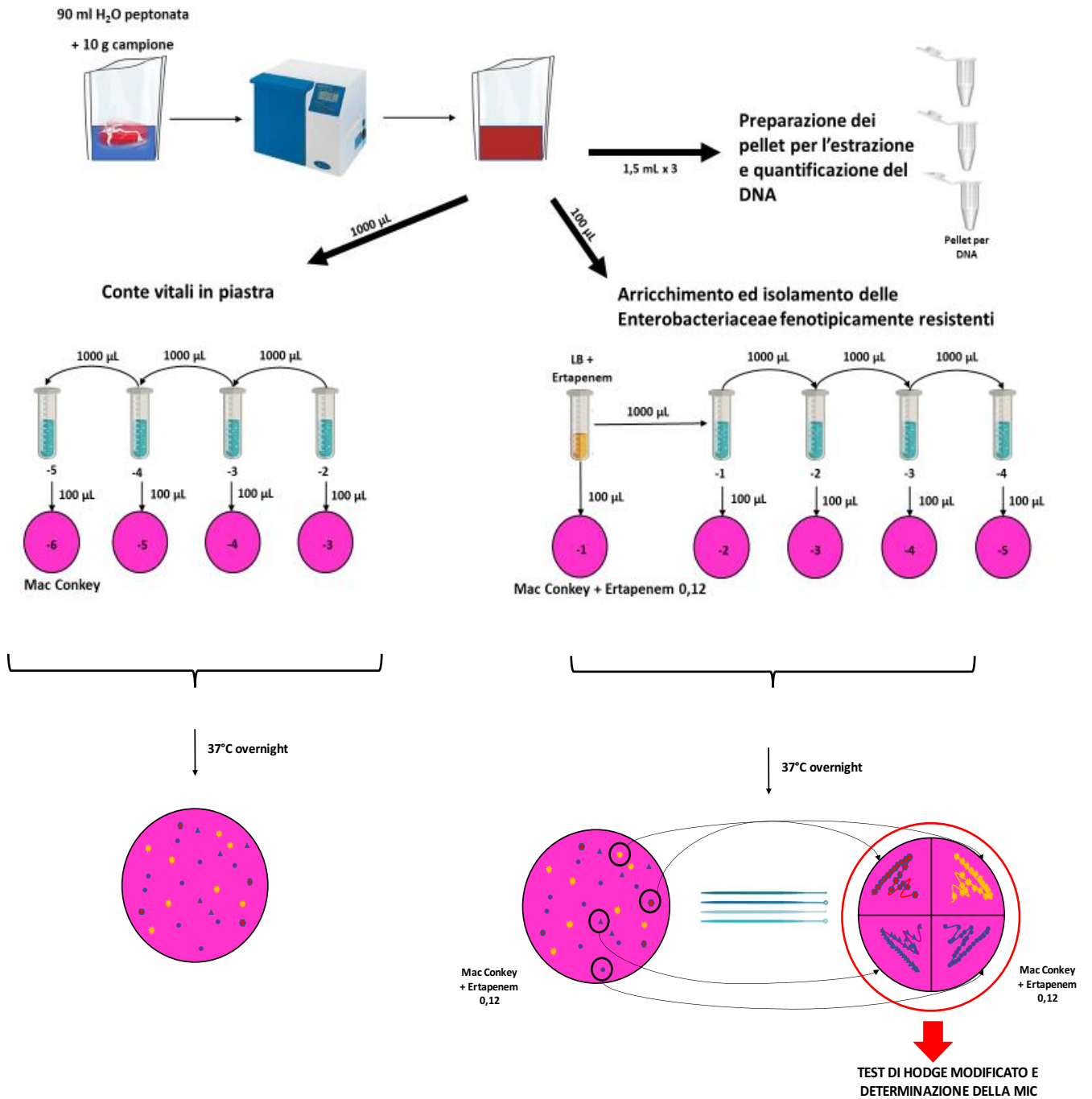
(Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis)

Idrolizzato acido di caseina	17,5 g/L
Infuso di cuore bovino	2,0 g/L
Amido solubile	1,5 g/L
Agar	17,0 g/L
pH 7,3 ± 0,2 a 25°C	

Tutti i terreni sono stati sterilizzati in autoclave azionata a 121°C per 15 minuti.

Una volta preparati i vari substrati di crescita, questi sono stati utilizzati per effettuare le varie analisi. In *Figura 5* vengono riportati e riassunti i vari step, suddivisi che sono stati eseguiti sui vari campioni.

Figura 5 Schema di analisi



2.3 Le conte vitali in piastra

Al fine di enumerare le *Enterobacteriaceae* presenti nei campioni analizzati, sono state eseguite delle conte vitali in piastra. Inizialmente, per ottenere gli omogenati, sono stati pesati, per ogni campione, in condizioni di sterilità, 10 g ed inseriti, insieme a 90 ml di acqua peptonata sterile, in un sacchetto sterile per Stomacher. Questi sono stati poi posti in Stomacher® 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia), azionando il macchinario a 260 rpm (revolutions per minute) per 3 minuti nel caso dei campioni di carne, fegato e reni, 230 rpm per 1 minuto nel caso di mangime e feci, poiché meno consistenti. Gli omogenati così ottenuti rappresentavano la prima diluizione dei campioni (10^{-1}), perché ottenuti inserendo una parte di campione in 9 parti di acqua peptonata.

Da questi omogenati sono poi state eseguite le successive diluizioni seriali decimali in tubi contenenti 9 mL di acqua peptonata sterile. Nel caso delle feci e del mangime sono state fatte delle diluizioni fino alla 10^{-5} , mentre per i campioni di carne, fegato e reni è stata realizzata solo una diluizione, passando dalla 10^{-1} (omogenato) alla 10^{-2} . Questo poiché ci si aspettava una concentrazione molto maggiore di microrganismi nel materiale fecale e nel mangime rispetto a quella di carne, fegato e reni come verificato da prove precedenti effettuate nell'ambito dello stesso progetto di ricerca.

Per eseguire le diluizioni è stato prelevato, per ogni campione, con una micro-pipetta da 1000 μ L, 1 mL di sospensione cellulare della diluizione precedente e inserito in un tubo contenente 9 mL di acqua peptonata, ottenendo così la diluizione successiva. Si è proceduto quindi, fino ad ottenere il numero di diluizioni seriali decimali necessarie.

A questo punto è stata eseguita una semina per spatolamento delle varie diluizioni nelle piastre Petri contenenti MacConkey Agar in doppio.

Le piastre sono state così incubate capovolte a 37°C per 24 ore. Il giorno successivo è stata eseguita la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) per ogni campione, effettuando una conta totale delle *Enterobacteriaceae* presenti. Per ciascun campione, il conteggio è iniziato dalla piastra in cui le colonie erano contabili, infatti, nelle piastre meno diluite i margini delle colonie formatesi erano confluenti e quindi le colonie indistinguibili. Tra le piastre con colonie contabili si considerano poi quelle in cui il numero delle colonie è compreso tra le 30 e le 300: cioè un numero non troppo basso (perché statisticamente non significativo) ma neanche troppo alto (da non essere contabile a causa della confluenza delle colonie).

Per la conta è stata, a questo punto, applicata l'*Equazione 3*, moltiplicando quindi il numero di colonie (UFC) per il fattore di conversione (f_c) che è l'inverso del fattore di diluizione.

Equazione 3 Formula applicata per la determinazione delle UFC/ml

$$\frac{UFC}{ml} = UFC \times f_c$$

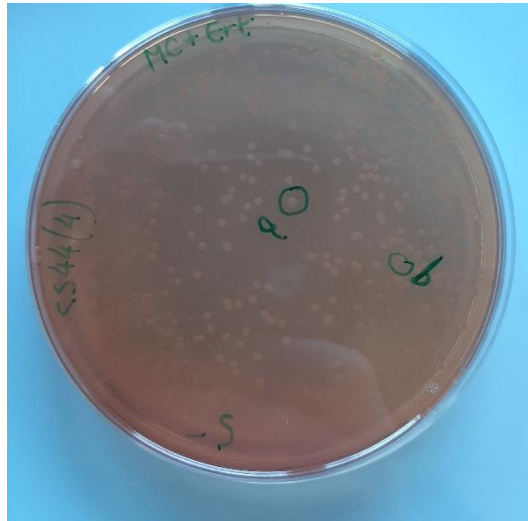
2.4 Arricchimento ed isolamento delle *Enterobacteriaceae* Carbapeneme-resistenti

Parallelamente alle operazioni necessarie per le conte vitali in piastra si è proceduto all'isolamento delle CRE. Da ogni omogenato iniziale, ottenuto con 10 g di campione e 90 mL di acqua peptonata, è stata prelevata, con micro-pipette sterili, una dose di sospensione cellulare dal volume di 100 μ L, inserita nel tubo contenente LB ed ertapenem e successivamente incubata a 37°C per 24 ore. In questo modo sono stati selezionati solo quei microrganismi in grado di sopravvivere ed accrescersi in presenza dell'antibiotico.

Da queste sospensioni cellulari sono state poi eseguite, per ogni campione, 4 diluizioni decimali seriali ottenendo le diluizioni dalla 10^{-1} fino alla 10^{-4} . Le sospensioni cellulari e le relative diluizioni sono poi state seminate per spatolamento prelevando ed inoculando 100 μ L delle stesse su piastre Petri contenenti MacConkey Agar ed ertapenem (0,12 μ g/mL). In questo modo si sono ottenute piastre con diluizioni dalla 10^{-1} fino alla 10^{-5} . Tutte le operazioni sono state svolte in condizioni di sterilità. A questo punto le piastre sono state lasciate incubare a 37°C per 24 ore.

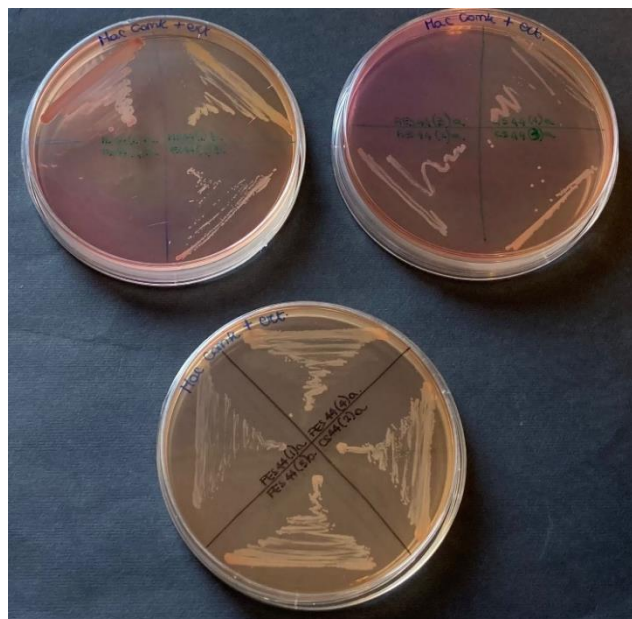
Il giorno successivo si sono quindi eseguiti gli isolamenti delle *Enterobacteriaceae* che risultavano resistenti. Nelle piastre incubate, infatti, i batteri resistenti selezionati dall'ertapenem si erano moltiplicati, dando origine a colonie visibili. Per ogni piastra, grazie ad un'indagine visiva, si sono selezionate le colonie morfologicamente differenti per colore, o conformazione che sarebbero state poi isolate (*Figura 6*).

Figura 6 Individuazione e selezione delle colonie morfologicamente diverse



Successivamente, con l'ausilio di un'ansa da batteriologia, le colonie selezionate sono state prelevate e isolate in coltura pura su piastre sterili. Queste ultime contenevano il medesimo terreno di coltura utilizzato per lo sviluppo delle CRE e, prima dello striscio sono state suddivise in quattro quadranti dedicati ciascuno ad un'unica colonia morfologicamente diversa. Le operazioni si sono svolte in condizioni di sterilità, in prossimità di una fiamma. Le piastre contenenti gli strisci sono state poi incubate a 37°C per 24 ore. Il giorno seguente gli strisci risultavano visibili ed erano presenti colonie distinguibili (Figura 7).

Figura 7 Strisci in coltura pura delle colonie selezionate



2.5 Test di Hodge e determinazione della Concentrazione Minima Inibente

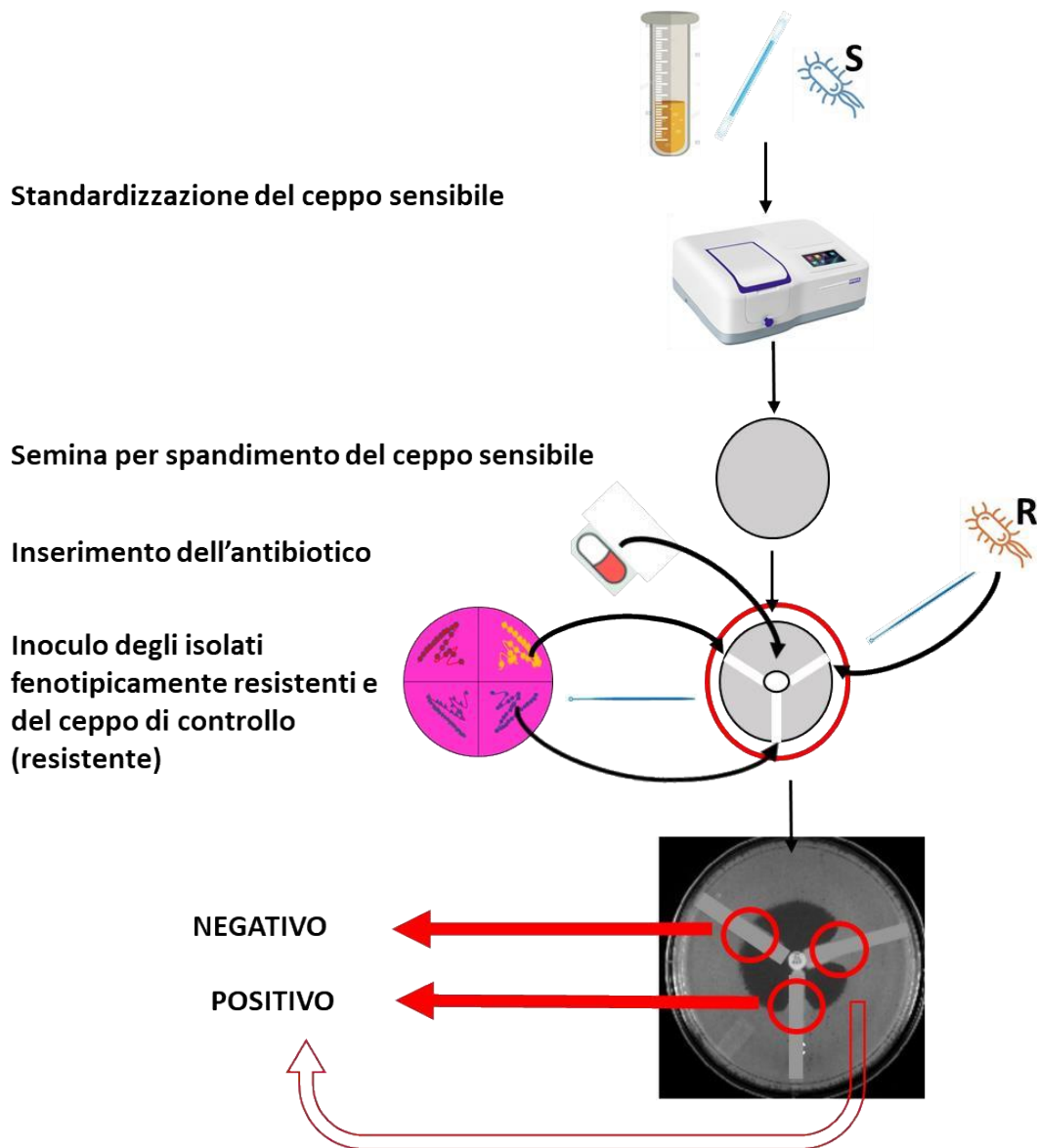
Il Test di Hodge Modificato (MHT) è un test fenotipico che viene utilizzato per valutare la produzione di carbapenemasi da parte dei batteri. In questo studio il MHT è stato effettuato per valutare se la crescita degli isolati in presenza di ertapenem (0,12 µg/mL) fosse dovuta o meno alla produzione di carbapenemasi. Il MHT si basa infatti sulla possibilità dell'isolato da testare di permettere o meno l'accrescimento di un ceppo di controllo sensibile ai Carbapenemi, *E. coli* ATCC® 25922, nella zona di inibizione dell'antibiotico. La crescita del ceppo di controllo in questa zona può di fatto essere resa possibile solo nel caso in cui il campione da testare sia in grado di inattivare il Carbapeneme mediante la produzione di carbapenemasi. Il MHT viene quindi indicato in letteratura come valido approccio iniziale per valutare la produzione di carbapenemasi negli isolati fenotipicamente resistenti (Nordmann et al., 2012).

Per eseguire il test, come primo step, si è proceduto alla standardizzazione del ceppo sensibile *E. coli* ATCC® 25922. La standardizzazione è stata effettuata prelevando, con un tampone, una colonia del ceppo che è stata poi stemperata in terreno MHII Broth ed in seguito standardizzata alla concentrazione desiderata. Per la determinazione e correzione della concentrazione della sospensione cellulare si è ricorso a misure turbidimetriche, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda di 625 nm. Lo spettrofotometro misura la densità ottica del mezzo analizzato, indicando quindi la torbidità della sospensione cellulare, proporzionale alla massa totale delle cellule presenti nella stessa. Il valore di densità ottica della sospensione cellulare desiderato corrispondeva a 0,1, pari ad una concentrazione di 1×10^8 UFC/mL. Questa concentrazione è stata pertanto raggiunta mediante l'aggiunta, alla sospensione batterica, di terreno MHII Broth fino all'ottenimento del giusto valore di densità ottica. La diluizione della sospensione cellulare del ceppo sensibile standardizzato, così ottenuta, è stata quindi seminata su una piastra contenente MH agar, utilizzando un tampone imbevuto in questa sospensione batterica.

A questo punto, sulle piastre seminate, al centro di ciascuna, si è posto un dischetto imbevuto di 10 µg di ertapenem. Successivamente, sono stati prelevati ed inoculati gli isolati, mediante l'ausilio di un'ansa da batteriologia, su uno dei tre raggi della piastra, effettuando uno striscio dal centro verso l'esterno della piastra. Ciascuna piastra, in particolare, è stata utilizzata per testare due isolati fenotipicamente resistenti: il terzo raggio, infatti, è stato utilizzato come controllo, inoculando un ceppo standardizzato produttore di carbapenemasi attive contro ertapenem, come *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™.

Le piastre così ottenute sono state incubate a 37° per 24 ore e sono poi state valutate: i ceppi produttori di carbapenemasi, come il controllo, vengono distinti dagli altri in quanto nella zona di intersezione tra l'isolato e il ceppo sensibile è possibile osservare un alone di inibizione della crescita deformato, grazie all'azione delle carbapenemasi che, inattivando l'ertapenem, consentono l'accrescimento del ceppo sensibile in tale zona. Il test dà esito negativo se, al contrario, l'alone di inibizione risulta perfettamente circolare (Figura 8).

Figura 8 Test di Hodge Modificato: schema



La Concentrazione Minima Inibente (MIC) viene definita come la più bassa concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita di un microrganismo (Andrews, 2001). La determinazione della MIC, metodologia analitica in questo caso non direttamente correlata alla produzione di carbapenemasi, è stata utilizzata nel presente studio come ulteriore test per verificare il livello di resistenza degli isolati che sono stati in grado di accrescersi in presenza di ertapenem e determinarne quindi l'effettiva resistenza. A tal proposito si sono applicate le procedure standard proposte dal "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI). In particolare, sono stati utilizzate delle microtiter: piastre formate da 96 pozzetti organizzate in righe e colonne. Lungo ogni colonna sono state effettuate delle diluizioni in serie dell'antibiotico da 8 a 0,0075 µg/mL, utilizzando il terreno liquido di coltura MHII, e lasciando i pozzetti dell'ultima colonna come pozzetti di controllo (privi di antibiotico), al fine di verificare l'effettiva crescita dei microrganismi saggiati. Lungo ciascuna riga della microtiter stati invece inoculati i diversi isolati fenotipicamente resistenti alla concentrazione di 0,12 µg/mL di ertapenem, per un totale di 8 isolati testati per ogni piastra. Per interpretare l'eventuale resistenza all'antibiotico ci si è attenuti alle linee guida emanate dal Comitato Europeo per i Test di Suscettibilità Antimicrobica (EUCAST): ente che definisce le modalità, ufficialmente riconosciute dall'Agenzia Europea della Medicina (EMA), per l'interpretazione dei risultati. L'EUCAST stabilisce infatti i breakpoints ufficiali, valori soglia che servono per definire una particolare categoria di suscettibilità del microrganismo all'antimicrobico. Questi vengono infatti utilizzati per separare le tre differenti categorie di suscettibilità:

- *sensibile*: se utilizzando un dosaggio standard dell'antibiotico, la crescita del microrganismo viene inibita;
- *intermedio* o sensibile all'aumento dell'esposizione: se il microrganismo viene inibito solo da un'esposizione a maggiore concentrazione dell'antibiotico, considerata una concentrazione limite;
- *resistente*: nel caso in cui il microrganismo non risulti sensibile nemmeno al livello limite di concentrazione dell'antibiotico, richiedendo un dosaggio tossico per l'organismo ospite e determinando l'inefficacia terapeutica dell'antibiotico per il quale è stato testato.

Per ogni antibiotico e per ogni categoria di microrganismo i breakpoints emanati da EUCAST sono variabili: nel dettaglio, considerando la resistenza delle *Enterobacteriaceae* fatte accrescere su un substrato contenente ertapenem, il breakpoint della resistenza è pari ad una MIC > 1 µg/mL.

Ai fini delle analisi, gli isolati in grado di crescere nei pozzetti contenenti ertapenem ad una concentrazione di 2, 4 o 8 µg/mL, sono quindi da considerarsi resistenti all'antibiotico. Questi risultati sono stati poi eventualmente confermati analizzando l'eventuale presenza di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi, in quei ceppi che mostravano una MIC maggiore o uguale a 1 µg/mL, appartenenti, rispettivamente, alla classe di resistenza o intermedia.

Per la preparazione delle analisi si sono dovute eseguire, in un primo momento, le varie diluizioni dell'antibiotico. Queste sono state ottenute partendo da una soluzione iniziale di ertapenem pari a 10000 µg/mL, che è stata diluita prelevando volumi noti della soluzione di antibiotico e aggiungendoli ad un determinato volume di brodo MHII, per ottenere un brodo contenente una concentrazione di ertapenem pari a 16 µg/mL. Quest'ultima soluzione equivalente al doppio della concentrazione massima utilizzata per effettuare la determinazione della MIC, è stata ulteriormente diluita come descritto nei passaggi seguenti. Mediante una pipetta multicanale sono stati quindi inseriti, in tutti i pozzetti, con esclusione di quelli presenti nella prima colonna del microtiter, 50 µL di MHII. In un secondo momento si sono inoculati, nei pozzetti della prima e della seconda colonna della piastra, 50 µL del brodo MHII contenente i 16 µg/mL di antibiotico, raggiungendo un volume totale di 100 µL e la concentrazione di antibiotico pari a 8 µg/mL. A questo punto sono state eseguite le diluizioni seriali, tramite il prelievo di 50 µL a partire da ciascun pozzetto della seconda colonna, inseriti in ogni pozzetto della terza. Dopo averli mescolati si sono prelevati 50 µL della terza colonna e inseriti nella quarta e così via, ad eccezione dei 50 µL prelevati dalla penultima ultima colonna che sono stati invece scartati, per lasciare privi di antibiotico i pozzetti dell'ultima colonna.

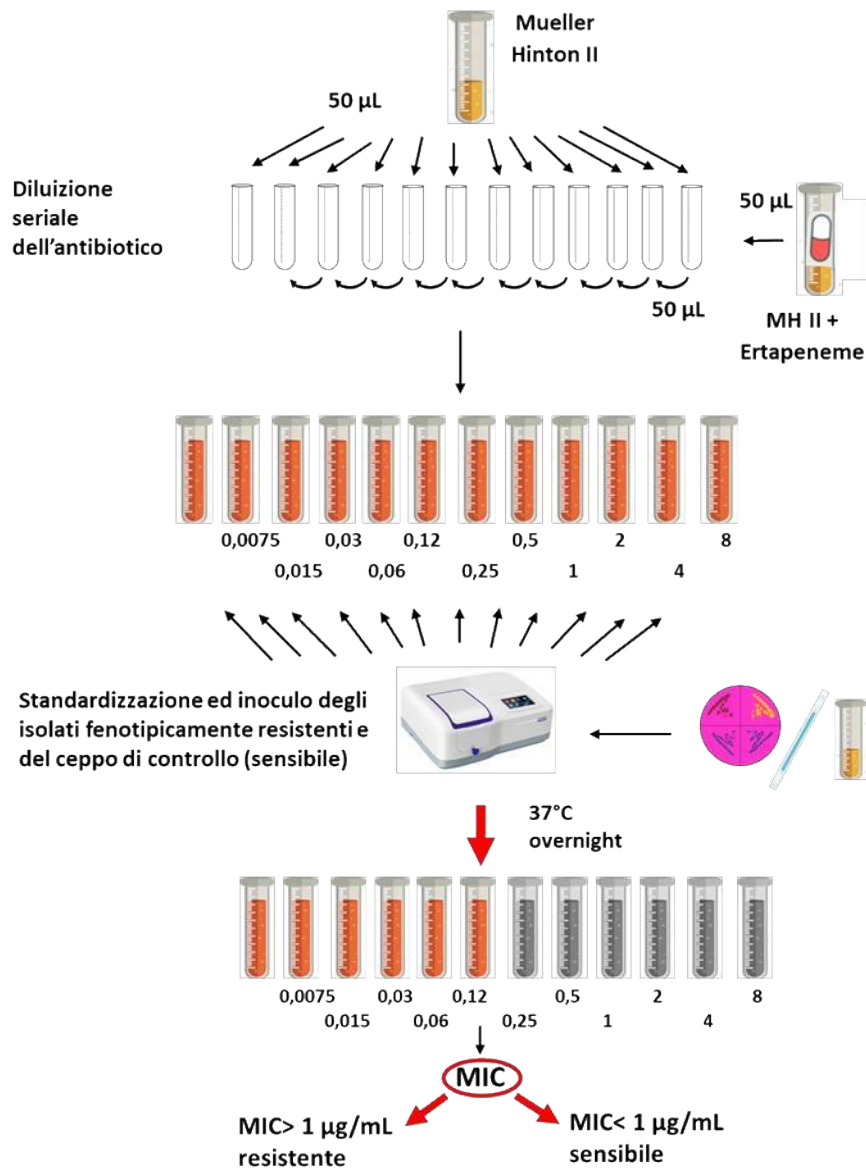
Si è proceduto quindi all'inoculazione dei ceppi provenienti dagli isolati fenotipicamente resistenti di *Enterobacteriaceae* da testare. Questi ceppi sono stati, prima dell'inoculo, standardizzati ad una concentrazione di 5×10^5 UFC/mL.

Per ottenere tale diluizione si opera in tre step, utilizzando uno spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda pari a 625 nm. In un primo momento i ceppi, mediante l'aggiunta di MHII Broth vengono portate ad una densità ottica compresa tra 0,08 e 0,12, corrispondente ad una concentrazione di 1×10^8 UFC/mL. Successivamente tale sospensione cellulare subisce una diluizione 1:100 mediante l'inoculo di 50 µL in 5 mL di MHII Broth, raggiungendo una concentrazione di 1×10^6 UFC/mL. Infine, per ognuno degli otto ceppi testati in ogni piastra, sono stati prelevati dall'ultima sospensione 50 µL ed inseriti in tutti i pozzetti della relativa riga del microtiter.

Contenendo questi 50 µL di MHII Broth + ertapenem, dalle operazioni precedenti, si raggiunge una concentrazione pari a 5×10^5 UFC/mL. Per ottenere una riga di controllo, è stato inoculato un ceppo sensibile ad ertapenem, *E. coli* ATCC® 25922, del quale è stata determinata la MIC. La piastra è stata quindi incubata a 37° per 24h.

Passato questo arco di tempo, dopo una prima analisi del ceppo di controllo, verificando che rientrasse nei limiti noti previsti, la piastra è stata valutata grazie ai valori di riferimento pubblicate da EUCAST valutando la minima concentrazione dell'antibiotico in grado di inibire una crescita visibile del microrganismo, determinando quindi la MIC: i campioni con una MIC maggiore a 1 µg/mL vengono definiti resistenti ad ertapenem. I vari passaggi sono riassunti in *Figura 9*.

Figura 9 Test per la determinazione della Concentrazione Minima Inibente: schema



2.6 L'estrazione del DNA microbico

Per ogni campione, a partire dagli omogenati iniziali, ottenuti inserendo 10 g di campione in 90 mL di acqua peptonata, sono state prelevate, con micro-pipette sterili, delle sospensioni cellulari di 1,5 mL in triplice copia. Ogni sospensione è stata inserita, in condizioni di sterilità, in una provetta Eppendorf (*Figura 10*) e posta in centrifuga.

Figura 10 Pellet da omogenati per l'estrazione di DNA microbico totale



La centrifuga è stata azionata alla massima velocità per 5 minuti al fine di separare le due frazioni: il pellet e il surnatante. Quest'ultimo è stato poi eliminato e i pellet conservati a -20°C. I pellet ottenuti dagli omogenati sono stati utilizzati per l'estrazione e quantificazione del DNA microbico.

Per l'estrazione del DNA si è proceduto utilizzando uno specifico kit: "E.Z.N.A.® Soil DNA Kit" (Omega Bio-tek) e applicando i vari step indicati dallo stesso, che possono raggrupparsi in sei fasi:

- *lisi*: consiste nella rottura delle membrane cellulari per favorire la fuoriuscita degli acidi nucleici;
- *rimozione degli inibitori*: per inattivare eventuali nucleasi cellulari o altri enzimi che possono ostacolare le successive operazioni;
- *formazione dei legami*: il DNA, grazie all'utilizzo di particolari soluzioni, viene indotto a formare dei legami con una membrana in silice presente in una colonnina fornita dal Kit;
- *lavaggio*: consiste nell'allontanamento di eventuali contaminanti dalla membrana, per trattenere solo il DNA;

- *eluizione*: il DNA purificato presente nella membrana viene indotto, grazie all'utilizzo di specifiche soluzioni, a rompere i legami con la membrana, per essere raccolto in purezza in una nuova provetta Eppendorf ottenendo un volume di 100 μL di DNA eluito.

Poiché da precedenti analisi effettuate nello stesso ambito di ricerca l'estrazione del DNA dai campioni di carne è risultata difficoltosa e si ottenevano basse rese di DNA non sufficientemente puri per le analisi molecolari successive, sono state modificati gli ultimi step dell'estrazione relativi alla fase di eluizione. Precisamente, dopo l'inserimento del buffer di eluizione, i campioni sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per 15 minuti, anziché 1-2 minuti e, in seguito alla centrifugazione e al recupero dei filtrati, sono stati lasciati riposare per altri 15 minuti a temperatura ambiente, anziché 2 minuti come indicato dal Kit.

Il DNA così estratto è stato quantificato e conservato a -20°C per la successiva ricerca di geni codificanti per le carbapenemasi attraverso qPCR.

2.7 La quantificazione del DNA microbico mediante spettrofotometro

La quantificazione del DNA estratto dai vari campioni è stata eseguita mediante spettrofotometro *Spectrophotometer UV-1800* (Shimadzu Corporation, Giappone).

Il macchinario è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 260 nm, radiazione assorbita dalle basi azotate del DNA, in virtù della loro natura chimica. Si è proceduto quindi alla sua taratura inserendo in una cuvetta in quarzo 500 μL di acqua deionizzata sterile, con valore di assorbanza (ABS) pari a zero, utilizzata dal macchinario come confronto.

Successivamente, in un'altra cuvetta, sono stati inseriti, per ciascun campione, 5 μL di DNA e 495 μL di acqua deionizzata sterile, effettuando così una diluizione 1:100. A questo punto si è eseguita la lettura con lo spettrofotometro.

Lo spettrofotometro indica l'ABS, ovvero il valore di radiazione che il campione è in grado di assorbire. Questa è in relazione alla concentrazione di DNA nel campione. Sapendo che un campione con una concentrazione di DNA di 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ attraversato da una lunghezza d'onda di 260 nm fornisce un valore pari ad 1 ABS e che i campioni sono stati diluiti 1:100 è possibile, mediante una proporzione, ricavare l'*Equazione 4* e stimare dunque la concentrazione di DNA dei campioni.

Equazione 4 Concentrazione di DNA in funzione dell'assorbanza

$$DNA \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 50 \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) \times 100$$

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Enumerazione di *Enterobacteriaceae*

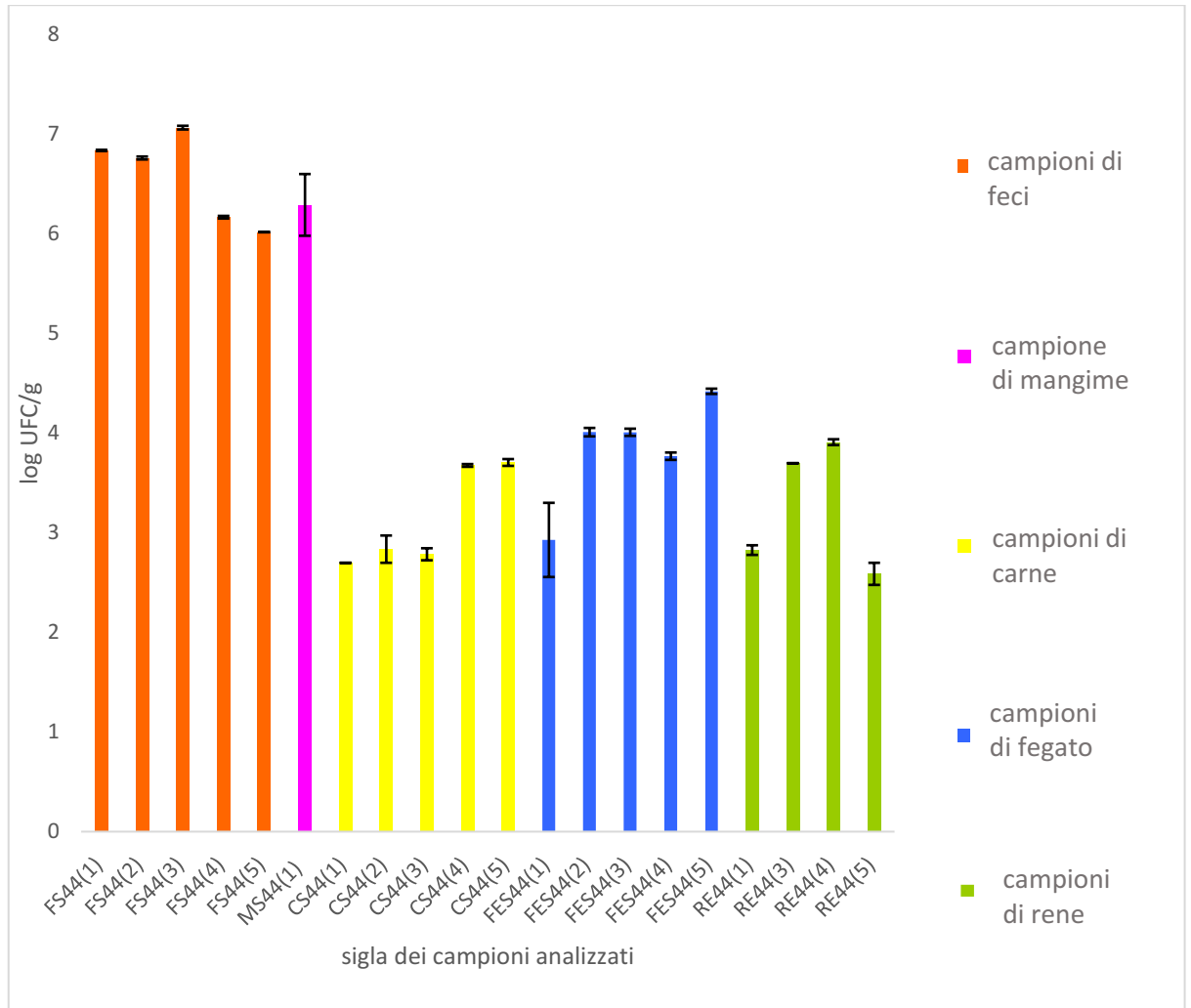
In *Tabella 6* sono riportati i risultati delle conte vitali in piastra. La conta è stata eseguita considerando le colonie totali. I risultati, espressi in logaritmo delle Unità Formanti Colonia per grammo (log UFC/g), sono stati ottenuti eseguendo la media dei valori ottenuti dalle piastre contabili e ne viene indicata la deviazione standard (D.S.) dalla media.

Tabella 6 Risultati delle conte vitali in piastra espressi in log UFC/g

CODICE	CAMPIONE	DATA	log UFC/g	
			MEDIA	D.S.
MS44(1)	Mangime suino	02/03/2021	6,29	0,44
FS44(1)	Feci suine	02/03/2021	6,84	0,01
FS44(2)	Feci suine	02/03/2021	6,76	0,02
FS44(3)	Feci suine	02/03/2021	7,07	0,03
FS44(4)	Feci suine	02/03/2021	6,17	0,02
FS44(5)	Feci suine	02/03/2021	6,02	0,00
CS44(1)	Carne suina	02/03/2021	2,70	0,00
CS44(2)	Carne suina	02/03/2021	2,84	0,19
CS44(3)	Carne suina	02/03/2021	2,78	0,09
CS44(4)	Carne suina	02/03/2021	3,68	0,02
CS44(5)	Carne suina	02/03/2021	3,71	0,05
FES44(1)	Fegato suino	02/03/2021	2,93	0,53
FES44(2)	Fegato suino	02/03/2021	4,01	0,06
FES44(3)	Fegato suino	02/03/2021	4,01	0,05
FES44(4)	Fegato suino	02/03/2021	3,77	0,05
FES44(5)	Fegato suino	02/03/2021	4,42	0,04
RE44(1)	Rene suino	02/03/2021	2,83	0,07
RE44(3)	Rene suino	02/03/2021	3,70	0,00
RE44(4)	Rene suino	02/03/2021	3,91	0,04
RE44(5)	Rene suino	02/03/2021	2,59	0,16

I dati ottenuti sono stati rielaborati nel grafico in *Figura 11*: i valori mostrano tra di loro una certa variabilità che però diminuisce se si considera la stessa matrice campionata. Inoltre, come è possibile notare e come atteso, le feci rappresentano il substrato con la carica di *Enterobacteriaceae* più elevata, mentre valori più bassi si riscontrano nei campioni di carne, fegato e reni.

Figura 11 Risultati della enumerazione di *Enterobacteriaceae* espresse in log UFC/g



Le *Enterobacteriaceae*, microrganismi ubiquitari dell'ambiente intestinale, possono rappresentare un rischio per la salute umana, in quanto sono in grado di comportarsi non solo da batteri commensali, ma anche come patogeni. Attraverso la filiera agroalimentare può verificarsi un passaggio di questi microrganismi dagli animali all'uomo: il controllo e la stima delle *Enterobacteriaceae* presenti negli animali allevati ha quindi il ruolo di valutare la carica complessiva di questi microrganismi negli allevamenti e nel prodotto carne.

Le *Enterobacteriaceae* presenti nelle feci campionate oscillano tra 10^6 - 10^7 UFC/g, numeri che rientrano nei valori normalmente osservati in questi substrati, dove sono generalmente compresi tra 10^5 fino a 10^9 UFC/g (Gresse et al., 2019). In particolare, alcuni studi descrivono la fase di allattamento come quella in cui si registra una maggior incidenza delle *Enterobacteriaceae* nelle feci, dove i valori delle conte possono aggirarsi tra 10^9 e 10^{10} UFC/g, per poi decrescere fino alla fase finale di ingrasso (Poulin-Laprade et al., 2021).

Per quanto riguarda l'analisi effettuata sul campione di mangime, il risultato ($2,5 \times 10^6$ UFC/g) mostra un valore abbastanza elevato, comparabile con i valori riscontrati nelle feci. I dati riportati in letteratura sulla ricerca di *Enterobacteriaceae* effettuate presso alcuni mangimifici, i valori più alti registrati si stabilizzano intorno alle 10^4 UFC/g in alcuni mangimi composti (Burns et al., 2015) e in alcune singole componenti mangimistiche quali la pula, lo sfarinato di frumento e il mais (Jones & Richardson, 2004).

La maggior parte degli studi sulla valutazione della carica complessiva di *Enterobacteriaceae* sono comunque eseguiti sul prodotto carne e i suoi derivati, in quanto rappresentano i principali vettori con i quali questi microrganismi dall'allevamento possono raggiungere l'uomo attraverso la dieta. Le *Enterobacteriaceae* si trovano nel lume del tratto digestivo, mentre sono normalmente assenti nella carne degli animali in vita: la presenza di questi microrganismi nei campioni di carne è quindi attribuibile ad una contaminazione, che avviene durante il processo di macellazione, dove i muscoli possono incontrare direttamente alcune matrici contaminate. La fase di scuoiatura, in particolare, risulta essere la fase più delicata in quanto la carne può accidentalmente contaminarsi entrando in contatto con peli e pelli, potenziali fonti di contaminazione, in quanto nell'allevamento si trovano in contatto diretto con il materiale fecale (Galler et al., 2021). I risultati trovati nel presente studio oscillano tra 10^2 e 10^3 UFC/g, valori leggermente più alti di quelli riportati negli studi effettuati nei mattatoi tedeschi, dove 10^2 UFC/g rappresenta il limite massimo riscontrato (Schill et al., 2017). Tuttavia, questi risultati sono comparabili con quelli che si ritrovano nella carne di pollo (filetto) appena macellato (Von Tippelskirch et al., 2018) e sono in linea con i valori registrati in alcuni mattatoi del nord Italia (Di Ciccio et al., 2016).

Tali risultati sottolineano inoltre che la carne può contaminarsi ed è quindi possibile il passaggio di questi batteri dall'allevamento al prodotto. Anche se la cottura della carne è in grado di uccidere questi microrganismi, rendendo il prodotto sicuro, il DNA dei batteri uccisi può comunque essere ingerito e arrivare al microbiota intestinale: è quindi essenziale che le comunità batteriche degli allevamenti non presentino geni di resistenza ai Carbapenemi.

Le *Enterobacteriaceae* ritrovate nei campioni di rene e fegato, che oscillano rispettivamente tra 10^1 e 10^4 UFC/g e tra 10^3 e 10^5 UFC/g, mostrano valori simili e comparabili a quelli presenti nelle carni. I risultati del campione RE44(2) non sono stati riportati per delle problematiche nella fase di sperimentazione.

Dalle 21 semine effettuate su MacConkey Agar + ertapenem (0,12 μ g/mL) si sono ottenute, per tutti i campioni, da 1 a 3 colonie morfologicamente differenti che erano fenotipicamente resistenti a quella determinata concentrazione di ertapenem. Tuttavia, sono stati utilizzati 21 isolati per le successive analisi di conferma della resistenza (1 isolato per ogni campione). Alla resistenza fenotipica non corrisponde infatti necessariamente una presenza di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi e inoltre, per essere definito resistente, un microrganismo deve rispettare specifiche condizioni: a tal proposito sono stati effettuati il MHT e la determinazione della MIC.

3.2. Risultati del Test di Hodge e della determinazione della MIC

Come visibile in *Tabella 7* il Test di Hodge modificato ha mostrato esito negativo per tutti i campioni analizzati, valori confermati dalla determinazione della MIC che ha escluso la presenza di isolati resistenti, con risultati compresi tra 1 µg/mL e < 0,25 µg/mL.

Tabella 7 Risultati del Test di Hodge modificato e della determinazione della Concentrazione Minima Inibente (µg/mL) degli isolati fenotipicamente resistenti

CODICE	CAMPIONE	MHT	MIC (µg/mL)
MS44(1)	Mangime suino	-	1
FS44(1)	Feci suine	-	1
FS44(2)	Feci suine	-	0,5
FS44(3)	Feci suine	-	0,5
FS44(4)	Feci suine	-	<0,25
FS44(5)	Feci suine	-	0,5
CS44(1)	Carne suina	-	<0,25
CS44(2)	Carne suina	-	<0,25
CS44(3)	Carne suina	-	<0,25
CS44(4)	Carne suina	-	1
CS44(5)	Carne suina	-	1
FES44(1)	Fegato suino	-	<0,25
FES44(2)	Fegato suino	-	0,5
FES44(3)	Fegato suino	-	0,5
FES44(4)	Fegato suino	-	0,25
FES44(5)	Fegato suino	-	<0,25
RE44(1)	Rene suino	-	<0,25
RE44(2)	Rene suino	-	<0,25
RE44(3)	Rene suino	-	0,25
RE44(4)	Rene suino	-	0,5
RE44(5)	Rene suino	-	0,25

I risultati del Test di Hodge modificato indicano quindi l'attuale assenza di isolati resistenti ai Carbapenemi dai campioni dell'allevamento analizzato. La determinazione della MIC ha invece evidenziato che i differenti isolati appartenevano alle classi sensibile e intermedia elaborate dal Comitato Europeo per i Test di Suscettibilità Antimicrobica, mentre nessun batterio era da considerarsi effettivamente resistente ad ertapenem, in quanto la crescita di tutti i microrganismi veniva arrestata da una concentrazione superiore a 1 µg/mL di ertapenem.

Lo studio effettuato nella presente Tesi di Laurea dimostra quindi l'assenza di *Enterobacteriaceae* resistenti ai Carbapenemi nei campioni analizzati appartenenti ad una azienda della filiera suinicola della regione Marche. Tale dato è in linea con i precedenti lavori di Tesi e di Ricerca effettuati nell'ambito dello stesso progetto, nei quali si è riscontrata una bassissima incidenza di questi microrganismi resistenti. Tali risultati, seppur confortanti, dovranno essere combinati con i risultati dell'analisi coltura-indipendente che ci fornirà un quadro più completo.

3.3. La quantificazione del DNA mediante spettrofotometro

I risultati della determinazione della concentrazione del DNA microbico totale nei vari campioni sono riportati in *Tabella 8*.

Tabella 8 Risultati della quantificazione del DNA mediante spettrofotometro

CODICE	CAMPIONE	ABS₂₆₀	DNA (µg/µL)
FS44(1)	Feci suine	0,019	95
FS44(2)	Feci suine	0,028	140
FS44(3)	Feci suine	0,023	115
FS44(4)	Feci suine	0,019	95
FS44(5)	Feci suine	0,011	55
MS44(1)	Mangime suino	0,035	175
CS44(1)	Carne suina	0,018	90
CS44(2)	Carne suina	0,034	170
CS44(3)	Carne suina	0,010	50
CS44(4)	Carne suina	0,034	170
CS44(5)	Carne suina	0,030	150
FES44(1)	Fegato suino	0,052	260
FES44(2)	Fegato suino	0,022	110
FES44(3)	Fegato suino	0,040	200
FES44(4)	Fegato suino	0,032	160
FES44(5)	Fegato suino	0,039	195
RE44(1)	Rene suino	0,055	275
RE44(2)	Rene suino	0,061	305
RE44(3)	Rene suino	0,036	180
RE44(4)	Rene suino	0,012	60
RE44(5)	Rene suino	0,032	160

I dati ottenuti mostrano una certa variabilità, con una concentrazione minima (50 µg/µL) riscontrata in uno dei campioni di carne suina e una concentrazione massima (305 µg/µL) in uno dei campioni di rene.

In particolare, i campioni di feci contenevano una concentrazione di DNA compresa tra 95 e 140 µg/µL, mentre il mangime aveva una concentrazione di 175 µg/µL di DNA.

Per i campioni di fegato e rene si sono osservati, rispettivamente, valori oscillanti tra 110 e 260 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e tra 60 e 305 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

I campioni di carne hanno invece mostrato dei valori compresi tra 50 e 170 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

I DNA microbici estratti e quantificati saranno necessari per effettuare successive analisi molecolari e stabilire l'eventuale presenza di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi.

4. CONCLUSIONE

La presenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi nei prodotti provenienti dalle filiere agricole rappresenta una valida fonte di preoccupazione per la salute pubblica.

Il presente lavoro di Tesi ha avuto come scopo quello di contribuire a identificare eventuali serbatoi di resistenza (*Enterobacteriaceae* resistenti e geni di resistenza) ai Carbapenemi in alcuni allevamenti di suini della regione Marche. Tutti gli isolati (21) di *Enterobacteriaceae* ottenuti da feci, mangime, reni, fegato e carne, potenzialmente resistenti a ertapenem, hanno dato esito negativo ai test di conferma quali test di Hodge e MIC.

Si è proceduto inoltre all'estrazione e alla quantificazione del DNA microbico dagli omogenati dei campioni che verrà analizzato via qPCR per accertare l'assenza di geni codificanti carbapenemasi.

Dal duplice approccio (coltura-dipendente e -indipendente) si potrà avere una fotografia più completa riguardo la presenza di resistenze trasmissibili nei campioni analizzati, benché i risultati finora ottenuti siano rassicuranti da un punto di vista di sicurezza alimentare e Sanità Pubblica. Tuttavia, tale studio si inserisce in un progetto più ampio e dall'analisi di un grande numero di campioni si potrà delineare un quadro più completo. Si sottolinea comunque la necessità di un monitoraggio costante delle antibiotico-resistenze negli allevamenti, in quanto l'antibiotico-resistenza è un fenomeno evolutivo e dinamico che tiene conto dei flussi di microrganismi e geni tra diversi ecosistemi. Il presente lavoro vuole inoltre sensibilizzare gli operatori della filiera alimentare sull'attenzione che deve essere riposta nell'applicazione delle norme igieniche, specialmente nei punti che si sono rilevati critici: lo stoccaggio dei mangimi, che può contribuire ad una rapida diffusione dei microrganismi in tutti i settori dell'allevamento, e le pratiche di macellazione, dove le *Enterobacteriaceae* dell'intestino dell'animale possono contaminare la carne. Infine, questo studio si propone l'obiettivo di informare l'opinione pubblica su quanto sia essenziale un corretto utilizzo degli antibiotici, in quanto questi potrebbero svolgere un ruolo selettivo nei confronti di batteri contenenti geni codificanti resistenza nei riguardi degli antibiotici.

5. RINGRAZIAMENTI

A conclusione della presente Tesi di Laurea mi è doveroso ringraziare innanzitutto la mia relatrice, la Professoressa Cristiana Garofalo. La ringrazio non solo per i preziosi consigli che mi ha dispensato nella stesura di questo elaborato, ma soprattutto per avermi concesso questa preziosa opportunità con la quale ho affinato e maturato le mie competenze e capacità, affrontando un tema così interessante e sentito, applicato alla mia realtà territoriale.

Un sincero ringraziamento va alla Dottoressa Cristiana Cesaro per la sua straordinaria pazienza, capacità comunicativa e professionalità, con le quali mi ha seguito durante tutte le procedure analitiche. Un sentito grazie anche a Luca, per i suoi preziosi aiuti in laboratorio.

Desidero ringraziare anche la Professoressa Carla Vignaroli e con lei tutto il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) per la proficua collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), che ha consentito di portare avanti questi importanti studi sulla ricerca delle resistenze nelle filiere agroalimentari. Un ringraziamento alla professoressa Maria Federica Trombetta che si è occupata di contattare gli allevamenti per effettuare tutti i campionamenti.

Vorrei esprimere la mia più sentita gratitudine a tutti coloro che mi hanno sostenuto in questi tre anni. In particolare, gli amici di questo Percorso di Studio, Daniele e Chiara fra tutti, fedeli compagni di banco che hanno colorato tutte queste giornate, ma anche Valentina e Angelica, per i consigli e il sostegno datomi. Un ringraziamento speciale va alla mia Famiglia, senza la quale non avrei potuto raggiungere questo traguardo. Ringrazio i miei nonni, per avermi trasmesso fin da piccolo l'amore e la passione per la Terra.

Infine, desidero ringraziare coloro che più di tutti mi hanno fiancheggiato e accompagnato: Letizia e Lucrezia, con le quali ho condiviso i momenti più importanti in questi anni, Melissa, Ugo e Gabriele, che mi hanno sempre sostenuto, e soprattutto Marco, per avermi supportato e consigliato e senza il quale non avrei raggiunto questo meraviglioso traguardo.

Un infinito grazie a tutti voi.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ray, M. J., Lin, M. Y., Weistein, R. A. & Trick, W. E., 2016. Spread of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Among Illinois Healthcare Facilities: The Role of Patient Sharing. *Clinical Infectious Diseases*, 7(63), pp. 889-893.
- Anadòn, A., 2006. The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(1), pp. 41-44.
- Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 48, pp. 5-16.
- Antonelli, P. et al., 2019. Genes conferring resistance to critically important antimicrobials *Salmonella enterica* isolated from animals and food: A systematic review of the literature 2013-2017. *Reserch in Veterinary Science*, Issue 126, pp. 59-67.
- Aschbacher, R. et al., 2008. Linkage of acquired quinolone resistance (qnrS1) and metallo- β -lactamase (blaVIM-1) genes in multiple species of Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy. *Journal Antimicrob Chemother*, Volume 61, p. 515–523.
- Aschbacher, R. et al., 2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae during 2011-12 in the Bolzano area (Northern Italy): increasing diversity in a low-endemicity setting. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 77, pp. 354-356.
- Aschbacher, R. et al., 2011. Metallo-b- lactamases among Enterobacteriaceae from routine samples in an Italian tertiary care hospital and long-term care facilities during 2008. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 17, pp. 181-189.
- Blair, J. M. et al., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), pp. 42-51.
- Bonardi, S. & Pitino, R., 2019. Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian Journal of Food Safety*, 8(7956), pp. 77-92.

- Burns, A. M. et al., 2015. Salmonella occurrence and Enterobacteriaceae counts in pig feed ingredients and compound feed from feed mills in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 121(3-4), pp. 231-239.
- Canica, M. et al., 2015. Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Research in Microbiology*, Volume 166, pp. 594-600.
- Clementi, F. & Aquilanti, L., 2011. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*, Volume 17, pp. 394-398.
- Di Ciccio, P. et al., 2016. [Italian Journal of Food Safety 2016; 5:6151] Microbiological contamination in three large-scale pig slaughterhouses in Northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*, Volume 5, pp. 219-223.
- EFSA, 2013. Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystem, EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, Issue 11(12):3501.
- European Centre for Disease Prevention and Control and the European Medicines Agency, 2009. *The bacterial challenge: time to react*, Stoccolma: ECDC/EMA Joint Technical report.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2018. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe*, Svezia: ECDC.
- Fischer, J. et al., 2012. Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *Antimicrob Chemother*, pp. 1793-1795.
- Fischer, J. et al., 2017. Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in three German swine farms in 2011 and 2012. *Veterinary Microbiology*, Volume 200, pp. 118-123.
- Galler, H. et al., 2014. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2), pp. 132-134.
- Galler, H. et al., 2021. Multiresistant Bacteria Isolated from Intestinal Faeces of Farm Animals in Austria. *Antibiotics*, 10(4), p. 466.
- Garattini, S., 2020. *Gli antibiotici spiegati bene*. Piacenza: Edizioni LSWR.

- Garcia-Graells, C. et al., 2020. First detection of a plasmid located carbapenem resistant blaVIM-1 gene in E.coli isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 324, pp. 108624-31.
- Giani, T. et al., 2013. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveillance*, 18(22), p. 20489.
- Gresse, R. et al., 2019. Microbiota Composition and Functional Profiling Throughout the Gastrointestinal Tract of Commercial Weaning Piglets. *Microorganisms*, 7(9), p. 343.
- Guerra, B., Fischer, J. & Helmuth, R., 2014. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganism are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, Issue 171, pp. 290-297.
- Hamza, E., Dorgham, S. M. & Hamza, D. A., 2016. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 7, pp. 8-10.
- He, T. et al., 2017. Occurrence and characterization of blaNDM-5-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China. *Journal of Antimicrob Chemother*, Volume 72, pp. 90-94.
- Islam, M. A. et al., 2017. Environmental spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing multidrug-resistant bacteria in Dhaka, Bangladesh. *Application Environment Microbiology*, 83(15), p. 11.
- Jones, F. T. & Richardson, K. E., 2004. almonellain Commercially Manufactured Feeds. *Poultry Science*, 83(3), pp. 384-391.
- Kelly, A. M., Mathema, B. & Larson, E. L., 2017. Carbapeneme-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Issue 50, pp. 127-134.
- Klein, D., 2016. *Fondamenti di Chimica Organica*. Milano: Pearson Italia.
- Köck, R. et al., 2018. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing and companion animals: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 24, pp. 1241-1250.
- Madigan, M. et al., 2016. *BROCK Biologia dei microrganismi*. Milano: Pearson Italia.

- Meletis, G., 2016. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), pp. 15-21.
- Milanovic', V. et al., 2018. Investigation of the Dominant Microbiota in Ready-to-Eat Grasshoppers and Mealworms and Quantification of Carbapenem Resistance Genes by qPCR. *Frontiers in Microbiology*, 9(3036).
- Mills, M. C. & Lee, J., 2019. The threat of carbapeneme-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, Issue 225, pp. 113-143.
- Mollenkopf, D. F. et al., 2017. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Recovered from the Environment of a Swine Farrow-to-Finish Operation in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2).
- Nordmann, P. et al., 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 18, pp. 432-438.
- Patel, G. & Bonomo, R. A., 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4(48), pp. 1-17.
- Poulin-Laprade, D. et al., 2021. Resistance Determinants and Their Genetic Context in Enterobacteria from a Longitudinal Study of Pigs Reared under Various Husbandry Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 8, pp. 2612-2620.
- Savin, M. et al., 2020. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, Volume 727.
- Sawa, T., Kooguchi, K. & Moriyama, K., 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care*, 8(13), pp. 1-13.
- Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G. & Reich, F., 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 257, pp. 58-66.
- Spescha, C., Stephan, R. & Zweifel, C., 2006. Microbiological Contamination of Pig Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two European Union-Approved Abattoirs. *Journal of Food Protection*, 69(11), pp. 2568-2575.

- Tamburello, M. & Villone, G., 2016. *vincenzo tiberio. la scoperta degli antibiotici e la mancata produzione industriale del farmaco*. Campobasso, ..
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M., 2005. Mechanism of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 3, pp. 711-721.
- Von Tippelskirch, P. et al., 2018. Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 281, pp. 82-89.
- Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A., 2011. Carbapenems: Past, Present and Future. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Volume 55, pp. 4943-4960.
- Yang, F. et al., 2017. Discharge of KPC-2 genes from the WWTPs contributed to their enriched abundance in the receiving river. *Science of The Total Environment*, Volume 581-282, pp. 136-143.
- Zhang, R., Wai-chi Chan, E., Zhou, H. & Chen, S., 2017. Prevalence and genetic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae strains in China. *The Lancet*, Volume 17, p. 256.
- Zurfluh, K. et al., 2017. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *International Journal Antimicrobiology Agents*, 50(3), pp. 436-440.