INDICE

1 - INTRODUZIONE 1
1.1 Le beta-lattamasi: aspetti generali e classificazione 5
Classe A 7
Classe B 8
Classe C 9
Classe D 9
2 - SCOPO DELLA RICERCA 11
3 - MATERIALI E METODI 12
3.1 - Ceppi batterici 12
3.2 - Terreni di coltura e sostanze chimiche utilizzate 14
3.3 - Principali soluzioni utilizzate 15
Tris-Acetato- EDTA (TAE) 15
Tris-borato-EDTA (TBE) 15
EDTA 15
3.4 - Procedure di analisi fenotipica 16
Antibiogramma: procedura operativa e interpretazione dei risultati 16
Determinazione fenotipica di produzione di ESBL 18
Microdiluizione in brodo 19
3.5 - Procedure di analisi genotipica 21
Estrazione DNA genomico 21
Tecnica di PCR per le indagini molecolari 23
PCR Multiplex 26
Elettroforesi in gel di agarosio 27
3.6 - Metodiche di tipizzazione 29
ERIC PCR 29
Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): 32
digestione enzimatica con XbaI 32
Sequenziamento 35
4 - RISULTATI 36
Caratterizzazione degli isolati di *E. coli* carbapenemasi-produttori 36
4.1 - Distribuzione delle carbapenemasi ed analisi del resistoma 38
4.2 - Associazione con gli altri geni di beta lattamasi 40
4.3 - Risultati dell'analisi di tipizzazione 42
5 – DISCUSSIONE 44
BIBLIOGRAFIA 49

1 - INTRODUZIONE

Con il termine di resistenza antimicrobica (AMR in breve) si intende la capacità di un dato batterio di acquisire una resistenza nei confronti di un antimicrobico al quale era precedentemente sensibile. Si tratta di un meccanismo del tutto naturale di adattamento microbico per cui, a seguito dell'insorgere di un cambiamento dell'habitat protratto nel tempo (in questo caso l'introduzione della molecola antimicrobica), nell'ambito delle mutazioni spontanee che si verificano normalmente, si attua una selezione di quelle che permettono lo sviluppo di un fenotipo resistente di sopravvivenza in quell'ambiente.

A seguito della scoperta della penicillina alla fine degli anni '20 e con la sua introduzione in terapia a partire dagli anni '40 è iniziata la cosiddetta era antibiotica, che ha rivoluzionato l'approccio delle malattie infettive. La scoperta di nuove molecole sempre più efficaci ed il loro ampio utilizzo in medicina ha però nello stesso tempo facilitato la comparsa delle resistenze antimicrobiche. Questo fenomeno è diventato sempre più importante, unito al fatto che soprattutto nel nuovo millennio vi sono serie difficoltà nello scoprire e sintetizzare nuove molecole capaci di contrastare il diffondersi di ceppi sempre più resistenti, come lo sono alcuni dei più importanti patogeni ospedalieri.

Il fenomeno dell'AMR, che come abbiamo visto è un fenomeno di adattamento naturale, è stato ulteriormente promosso da un non sempre corretto uso di questi farmaci nella pratica medica, così come da un vero e proprio abuso di antibiotici negli allevamenti di animali destinati al consumo umano.

L'AMR è considerata una delle maggiori minacce mondiali in ambito sanitario con importanti ricadute anche in campo economico. Secondo quanto affermato dalla World Health Organization nel 2015, è necessario prendere misure preventive efficaci nel più breve tempo possibile e in modo coordinato. Un precedente rapporto sull'AMR del 2014 (O'Neill J, 2014) ha valutato che se non si attuano azioni tempestive, nel 2050 il costo in termini di vite umane ammonterà a circa 10 milioni/anno e vi sarà una pesante ricaduta a livello economico, con una riduzione del PIL pari a valori percentuali dal 2 al 3,5%.

Per quanto lo sviluppo di AMR sia legato a qualsiasi specie batterica, di profonda preoccupazione risulta essere attualmente la diffusione pressoché globale di enterobatteri resistenti ai carbapenemi (Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, CRE), una famiglia di microrganismi normalmente commensali della flora intestinale e quindi facilmente diffusibili nella popolazione, ma allo stesso tempo causa più comune di infezioni associate all'assistenza medica.

L'emergenza di ceppi CRE è stata favorita dal sempre più diffuso utilizzo (e spesso abuso) di farmaci ß-lattamici con più ampio spettro di azione, e di elezione sono stati gli antibiotici facenti parte della classe dei carbapenemi, ossia ß-lattamici di ultima linea per il trattamento delle infezioni sostenute da diversi batteri Gram-negativi multi-resistenti (Multi-Drug Resistant, MDR), tra cui in particolare isolati di *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro, rapidamente diffusisi nel mondo nelle ultime decadi. Purtroppo, l'allargamento del fenomeno dell'AMR e il conseguente uso intensivo di carbapenemi e di altri farmaci salva vita, ha favorito al contrario la comparsa di ulteriori resistenze mediante la produzione di enzimi inibitori (carbapenemasi) o mutazioni cromosomiche adattative, che hanno di fatto portato alla perdita di efficacia di queste promettenti molecole di ultima generazione. Ciò ha comportato inevitabilmente un forte incremento di morbosità e mortalità per infezioni fino a pochi anni fa trattabili efficacemente, ragion per cui i ceppi CRE sono stati recentemente inclusi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come agenti patogeni prioritari per i quali è necessario attuare protocolli di ricerca e di sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici (WHO 2017).

A seconda del meccanismo alla base dell'acquisizione della resistenza ai carbapenemi, le *Enterobacteriaceae* si possono distinguere in ceppi resistenti ai carbapenemi (CRE) ed in ceppi produttori di carbapenemasi (CPE). Nel primo caso i meccanismi alla base della resistenza sono vari e spesso associati, derivanti da mutazioni cromosomiche adattative; possono consistere in iperproduzione di β-lattamasi di tipo AmpC (cefalosporinasi), produzione di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), perdita o modificazione delle porine con conseguente riduzione della permeabilità della membrana esterna e iper-espressione di pompe di efflusso. Nel

secondo caso, invece, il meccanismo alla base della resistenza riguarda essenzialmente la produzione di carbapenemasi, ossia particolari enzimi capaci di idrolizzare i carbapenemi. Questo è il meccanismo di gran lunga più importante a livello clinico e quello che ha contribuito alla rapida espansione della resistenza ai carbapenemi a livello mondiale.

Le carbapenemasi sono molto variabili tra loro per tipo e spettro d'attività antimicrobica, alcune idrolizzano i carbapenemi con grande efficienza, mentre altre hanno un'attività più debole, alcune sono inibite (o parzialmente inibite) da inibitori di ß-lattamasi come l'acido clavulanico o il tazobactam, altre non sono inibite da nessun agente clinicamente disponibile. Complessivamente sono enzimi che conferiscono resistenza o non sensibilità a tutti o quasi tutti i β-lattamici; inoltre, gran parte dei ceppi CPE sono fenotipicamente MDR (*Multi-Drug Resistant*), ossia resistenti o non suscettibili ad almeno un antibiotico in 3 classi antimicrobiche differenti, XDR (*eXtensively-Drug Resistant*), resistenti o non suscettibili ad almeno un antibiotico in tutte le classi antimicrobiche eccetto 1-2 o PDR (*Pan-Drug Resistant*)resistenti o non suscettibili al pannello completo di antibiotici testati di routine (Magiorakos et al., 2012).

I geni che codificano le carbapenemasi sono prevalentemente a localizzazione plasmidica, e questa risulta essere la caratteristica fondamentale che ne consente la rapida diffusione. Tali elementi genici possono essere facilmente propagati per trasferimento genico orizzontale nell'ambito di diverse specie batteriche Gram-negative, processo ulteriormente favorito dall'ambiente naturale delle *Enterobacteriaceae*, l'intestino sia umano che animale. Un ruolo importante che è emerso dagli studi epidemiologici e genetici è il background genetico dei geni di carbapenemasi. Questi studi hanno posto in luce l'emergenza di geni funzionali in specifici cloni batterici definiti di successo, cioè cloni che possiedono caratteristiche che li rendono più facilmente trasmissibili da un paziente all'altro o più virulenti o capaci di sopravvivere più a lungo su veicoli e superfici(Nordmann et al., 2014).

La rapida espansione degli organismi CRE e CPE è un problema che va affrontato sotto molteplici aspetti. Le infezioni causate da questi ceppi sono difficili da trattare

poiché sono pressoché resistenti a tutti gli antibiotici β-lattamici e spesso presentano ulteriori meccanismi di resistenza contro altri antibiotici di seconda linea come aminoglicosidi e fluorochinoloni. Studi recenti hanno anche dimostrato la resistenza emergente agli antibiotici di ultima linea, ad esempio tigeciclina o colistina.

La riduzione delle risorse terapeutiche e la difficoltà di ottenere in breve tempo dei farmaci alternativi efficaci, rende necessario contenere la diffusione dei ceppi CPE. Ciò richiede una comprensione della distribuzione geografica di questi ceppi, dei serbatoi all'interno della popolazione e dei fattori di rischio per la loro acquisizione.

Nel 2012, il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) ha promosso l'avvio del progetto EuSCAPE (*European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) per studiare l'epidemiologia degli organismi e favorire un miglior scambio delle conoscenze, al fine di aumentare le capacità di diagnosi e sorveglianza dei laboratori in Europa.

Il rapporto più recente sulla situazione europea è derivato da uno studio condotto tra Novembre 2013 e Aprile 2014 che aveva coinvolto 455 ospedali sentinella in 36 paesi (Grundmann et al., 2017). I risultati più importanti riguardavano prima di tutto la differente distribuzione geografica dei ceppi CPE, con tassi di prevalenza più elevati nei paesi del Mediterraneo e dei Balcani. I dati confermavano la situazione critica in Italia, già evidenziata in studi di sorveglianza nazionale (Gianiet al., 2017): in Italia il tasso di isolati di CPE era di 6,0 pazienti ogni 10'000 ricoveri, un valore molto più alto della media europea, che invece era di 1,3/10'000. L'Italia mostrava una situazione diversa anche riguardo la tipologia di carbapenemasi prodotta, con una predominanza di carbapenemasi di tipo KPC (KPC-2, KPC-3 – 96% degli isolati), rispetto ai paesi dell'Europa settentrionale, dove era comune la diffusione di ceppi produttori di OXA-48. La situazione italiana era sovrapponibile a quella di altri paesi europei meridionali, come la Grecia, dove i ceppi KPC-produttori avevano una diffusione endemica. Tuttavia, il secondo aspetto emerso da questo studio era la proporzione tra le specie CPE isolate con una netta predominanza di isolati di *K. pneumoniae* rispetto ad *E. coli* in un rapporto medio europeo di 11:1, se pur con delle variazioni geografiche. In Italia, ad esempio, il

rapporto era nettamente a favore di isolati di *K. pneumoniae* (n. 195) rispetto ad E. coli (n. 5), e questo dato unitamente alla maggior diffusione di KPC riflettono la situazione endemica italiana. Difatti, gli enzimi KPC sono identificati di rado in *E. coli* e sono segnalati in quei paesi con la maggiore prevalenza di ceppi di *K.pneumoniae* KPC-produttori; probabilmente riflettono la disseminazione di questi geni di resistenza al di fuori dal serbatoio ospedaliero che è rappresentato proprio da *K. pneumoniae*.

Tuttavia questo trasferimento è di grande importanza poiché *E. coli* diffonde nella comunità molto più rapidamente di *K. pneumoniae*. Inoltre i ceppi di *E. coli*, che sono normalmente presenti nel tratto digestivo di uomini ed animali, fungono da vettori o da facilitatori per la trasmissione di plasmidi ad ampio spettro d'ospite tra diverse specie di enterobatteri, e possono quindi accelerare l'espansione epidemica dei geni di carbapenemasi.

1.1 Le beta-lattamasi: aspetti generali e classificazione

Come noto, l'azione dei ß-lattamici è bloccare la sintesi del peptidoglicano, principale componente della parete cellulare batterica, attraverso l'inibizione degli enzimi deputati alla reazione di transpeptidazione, le Penicillin Binding Proteins (PBP). Gli antibiotici ß-lattamici si dividono in 4 principali categorie, con caratteristiche chimiche e spettro di attività molto differenti: (1) Penicilline (es. penicillina, amoxicillina, ampicillina, oxacillina); (2) Cefalosporine (es. cefepime, ceftriaxone, cefixima); (3) Monobattami (es. aztreonam) e (4) Carbapenemi (es. imipenem, ertapenem, meropenem).

Le ß-lattamasi sono enzimi capaci di inattivare gli antibiotici ß-lattamici attraverso l'idrolisi del nucleo comune a tutte le molecole, l'anello ß-lattamico. Un recente review ha riportato la stima di oltre 2000 differenti enzimi di beta-lattamasi (Bush K, 2018) che seppur condividendo il medesimo meccanismo di azione, si differenziano per il substrato su cui agiscono. I geni che codificano questi enzimi (denominati geni *bla*) sono distribuiti sia nei batteri Gram-positivi che Gram-negativi, possono essere cromosomici o plasmidici, costitutivi o inducibili. Le carbapenemasi

rappresentano il gruppo più versatile tra le ß-lattamasi, oltre che il più importante al momento attuale.

Le ß-lattamasi possono essere classificate in vario modo, prima di tutto in base al meccanismo idrolitico e al sito attivo, oppure in base al profilo di inibizione, cioè lo spettro di molecole idrolizzate. La classificazione di gran lunga più utilizzata è la classificazione di Ambler che distingue le ß-lattamasi in quattro classi molecolari indicate con le lettere da A a D (Ambler RP, 1980). Le classi A, C e D presentano un residuo di serina nel loro sito catalitico (enzimi a serina), mentre la classe B comprende le metallo ß-lattamasi. Di seguito una breve descrizione di ciascuna classe di enzimi.

- **Classe A**. Accomunate dalla presenza di un residuo di serina a livello del sito attivo, sono comprese in questa categoria anche ß-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e alcune serina-carbapenemasi. Conferiscono resistenza a penicilline, monobattami, carbapenemi e cefalosporine (Livermore DM, 1995). Questa classe comprende gli enzimi KPC, TEM, SHV, CTX-M.
- **Classe B**. Sono incluse in questa classe tutte le metallo β-lattamasi (MBLs) che utilizzano un cofattore enzimatico metallico (solitamente Zn^{2+}) per espletare correttamente la loro azione idrolizzante; sono efficaci contro penicilline, cefalosporine e carbapenemi ma non interferiscono con i monobattami, inoltre la loro azione viene inibita da chelanti metallici come EDTA (Livermore DM, 1995). Questa classe comprende le carbapenemasi IMP, VIM, e NDM.
- **Classe C**. Indicate anche come cefalosporinasi, queste β-lattamasi sono attive su penicilline e cefalosporine. AmpC e CMY sono gli enzimi più rilevanti di questo gruppo.
- **Classe D**. Sono definite anche OXA-ß-lattamasi o oxacillinasi poiché idrolizzano più efficacemente le isossazolil-penicilline e sono attive su penicilline e cefalosporine. Importanti esempi sono OXA-48 (e il suo derivato OXA-181).

Classe A

KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemasi)

La carbapenemasi KPC è al momento l'enzima più significativo a livello clinico tra le serina-carbapenemasi di classe A. Dalla sua prima identificazione in *K. pneumoniae* (da qui il nome KPC) avvenuta nel 1996 negli Stati Uniti (Yigit et al., 2001) si è rapidamente diffusa in tutto il mondo (Lee et al.,2016). Questi enzimi possono essere prodotti da diverse specie patogene Gram-negative sebbene siano nettamente predominanti nella specie *K. pneumoniae*. Delle numerose varianti note di KPC, le più diffuse sono KPC-2 e KPC-3, i cui geni (*bla*KPC) sono in prevalenza plasmidici ed associati con la circolazione di specifici cloni di successo internazionale (ad esempio *K. pneumoniae* ST258 o *E. coli* ST131).

TEM

β-lattamasi di classe A, fu identificata nel 1963 in *E. coli* da una coltura fecale di un paziente di nome Temoneira, da cui l'acronimo TEM. Si trattava di fatto del primo enzima codificato da un "fattore R" trasferibile nei Gram-negativi (R_{TEM}) e ora noto come TEM-1. Esso è largamente diffuso: nel mondo più del 90% della resistenza all'ampicillina è dovuta proprio alla produzione di questo enzima. Le successive varianti identificate sono tutte prodotte in seguito a mutazioni puntiformi di *bla*TEM-1 e *bla*TEM-2 (le più antiche); inoltre alcune sostituzioni amminoacidiche in corrispondenza del sito attivo hanno prodotto alcune ß-lattamasi a spettro esteso (ESBL) di tipo TEM.

SHV

Il gene *bla*SHV-1, a collocazione plasmidica, ha una struttura molecolare simile a TEM-1 (68% di identità aminoacidica), enzima con cui condivide alcune proprietà, pur mostrando una maggiore attività nei confronti dell'ampicillina. Dalla sua prima identificazione negli anni '70 in *E. coli* (Bush K, 2018) ad oggi sono state descritte decine di varianti di SHV, sebbene SHV-5 e SHV-12 siano le varianti maggiormente identificate in tutto il mondo; tra queste alcune sono risultate attive anche verso le cefalosporine di terza generazione e sono pertanto considerate delle ESBL.

CTX-M

ß-lattamasi a spettro esteso di classe A tra le più importanti a livello clinico e con diffusione globale, prende il suo nome dalla grande capacità idrolitica nei confronti dell'antibiotico cefotaxime e ceftriaxone. Il gene *bla*CTX-M, trasmesso soprattutto tramite plasmidi, è stato trovato in almeno 26 specie batteriche, in particolare in *E. coli*, *K. pneumoniae*e e *Proteus mirabilis*. Sebbene le varianti dominanti di CTX-M possono presentare una diversa distribuzione geografica, CTX-M-15 e CTX-M-14 sono quelle più comuni, rilevate in tutto il mondo in agenti patogeni clinicamente importanti. CTX-M-15 risulta particolarmente diffusa in cloni pandemici internazionali di *E.coli* come ST131.

Classe B

IMP – Active on imipenem

IMP è stata la prima carbapenemasi identificata (da qui la scelta della denominazione IMP, active on imipenem). Venne riscontrata la prima volta nel 1991 in un ceppo di *Serratia marcescens* in Giappone (Ito et al., 1995). L'enzima, codificato dal gene *bla*IMP, idrolizza imipenem, cefalosporine e penicilline. Diffusa maggiormente in Asia, con particolare frequenza in Giappone, Cina orientale e Taiwan, viene riscontrata sporadicamente in tutto il mondo in ceppi facenti parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, tuttavia con una frequenza solitamente inferiore rispetto alle altre β-lattamasi (Nordmann et al.,2014).

VIM - Verona integron-encoded metallo-beta-lattamasi

Identificata per la prima volta a Verona in *Pseudomonas aeruginosa* (Lauretti et al., 1999) è stata successivamente dimostrata anche in membri della famiglia *Enterobacteriaceae* e si è rapidamente diffusa in tutto il mondo. La sua variante VIM-2 è stata trovata in Francia sempre in *P. aeruginosa* (Poirel et al., 2000). Nuove varianti VIM sono state identificate successivamente, sebbene le più frequenti a livello mondiale e le più rilevanti dal punto di vista clinico sono VIM-1 e VIM-2. Il gene codificante *bla*VIM è localizzato su elementi genetici noti come integroni che contengono spesso altri geni di resistenza. L'enzima VIM è considerato endemico nel sud Europa (Italia, Grecia e Spagna) e nel Sud-Est asiatico, ma non mancano casi riscontrati in Nord Europa e nel

continente africano. Di particolare interesse la diffusione in Grecia dove si osserva una condizione di endemia di ceppi produttori di VIM-1 (Nordmann et al,. 2014).

NDM - New Delhi metallo beta-lattamasi

Enzima molto diverso dagli altri inclusi nella classe B di Ambler, ne esistono attualmente una decina di varianti, scoperte soprattutto in Asia. La prima descrizione di questa carbapenemasi (NDM-1) risale al 2009 (Yong et al.,2009), quando ceppi di *E. coli* e *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi furono isolati da un paziente svedese di origine indiana che era stato ricoverato per un periodo di tempo a New Delhi. Ad oggi tale enzima è considerato endemico nel subcontinente indiano, particolarmente diffuso in India, Pakistan e Bangladesh (Lee et al.,2016).

Classe C

AmpC

Le AmpC sono cefalosporinasi inducibili a codificazione cromosomica. Non inibite dall'acido clavulanico, sono beta-lattamasi attive su cefalosporine a spettro ristretto, cefamicine e cefalosporine a spettro esteso di terza generazione, risultando però prive di attività verso i carbapenemi. AmpC rappresenta la prima identificazione di una ß-lattamasi, avvenuta in *Bacillus coli* nel 1940 (Bush K., 2018).

CMY.

Le cefalosporinasi di tipo CMY si differenziano dal tipo AmpC essenzialmente perché sono a codificazione plasmidica.

Classe D

OXA-48 e OXA-181

Alcune oxacillinasi di classe D dimostrano un'attività carbapenemasica, come OXA-48. Questa carbapenemasi, attiva soprattutto sull'imipenem, è stata identificata in diverse *Enterobacteriaceae* MDR; idrolizza lentamente carbapenemi e cefalosporine a spettro esteso ed è scarsamente inibita dalla maggior parte degli inibitori delle ß-lattamasi, fatta eccezione per Avibactam (Sader HS et al., 2017). L'enzima, prodotto dal gene *bla*OXA-48 a prevalente codificazione plasmidica, è stato scoperto in Turchia nel

2003 in un ceppo di *K. pneumoniae* (Poirel et al.,2004). Da allora, ceppi produttori di OXA-48 sono stati rilevati in epidemie ospedaliere in Turchia e identificati in diversi altri paesi. Endemica in Turchia, Marocco, Libia, Egitto, Tunisia e India, OXA-48 si riscontra sporadicamente anche in alcuni paesi europei, in particolare Spagna e Francia (Nordmann et al., 2014).

OXA-181 è una delle principali varianti aminoacidiche di OXA-48, con identiche proprietà idrolitiche, fu identificata in isolati enterobatteri di pazienti indiani (Nordmann et al., 2012). Tuttavia il contesto genetico di OXA-181 è completamente diverso da quello di OXA-48, indicando che non vi è correlazione tra i due geni nella diffusione attuale. Il gene *bla*OXA-181 è stato attualmente identificato in moltissimi paesi, ad esempio Francia, Regno Unito, Romania, Canada, Australia, Singapore.

Studi recenti hanno suggerito un'origine ambientale di OXA-48 e OXA-181 in batteri del genere *Shewanella* (*S. oneidensis* e *S. xiamenensis*) che funzionano da serbatoi naturali. La condivisione dello stesso habitat acquatico da parte di *Shewanella* spp. ed *Enterobacteriaceae* potrebbe spiegare la rapida disseminazione di questi enzimi (Nordmann et al., 2012).

I ceppi che producono OXA-48 e OXA-181 di solito presentano livelli molto bassi di resistenza ai carbapenemi, per questo può essere difficile dimostrare la produzione di questi enzimi in alcuni isolati che hanno altri meccanismi di resistenza come la produzione di ESBL e/o difetti nella permeabilità di membrana. Di conseguenza, la reale prevalenza di queste carbapenemasi nell'ambiente potrebbe essere sottostimata (Nordmann et al., 2012).

2 - SCOPO DELLA RICERCA

Come appena descritto, la disseminazione epidemica dei geni di carbapenemasi all'interno delle *Enterobacteriaceae* coinvolge con maggiore frequenza gli isolati di *K. pneumoniae*. Tuttavia, *E. coli* è la seconda specie in termini di frequenza di isolamento tra i CPE. E' importante non sottovalutare l'emergenza di questi isolati poiché, diversamente da *K. pneumoniae* che è principalmente un patogeno nosocomiale, gli isolati di *E. coli* sono responsabili di infezioni acquisite in ospedale ed in comunità; sono inoltre stati associati ad infezioni negli animali e sono altresì largamente diffusi nell'ambiente. Pertanto, *E. coli* può rappresentare un importante fattore di disseminazione nella comunità dei geni di carbapenemasi.

Lo scopo di questo studio è stato quello di attuare una ricerca retrospettiva degli isolati di *E. coli* produttori di carbapenemasi (CP-Ec) identificati da pazienti dell'Azienda Ospedaliera di Torrette dalla metà del 2015 fino alla fine del 2018 e di caratterizzare tali isolati in modo da ottenere informazioni sul tipo di carbapenemasi prodotta, sul livello di resistenza ai carbapenemi conferita, su altre co-resistenze ed avere un quadro più preciso della prevalenza di questi ceppi e del loro resistoma.

A completamento dello studio, tutti gli isolati verranno tipizzati a livello genomico al fine di stabilire le correlazioni filogenetiche.

3 - MATERIALI E METODI

3.1 - Ceppi batterici

In questo studio sono stati analizzati 22 ceppi di *E. coli* resistenti o con ridotta sensibilità ai carbapenemi. Tutti gli isolati erano stati ottenuti da pazienti ricoverati in vari reparti dell'Azienda Ospedali Riuniti di Ancona da Agosto 2015 a Dicembre 2018. Nell'indagine sono stati inclusi sia isolati provenienti dallo stesso paziente ma ottenuti durante differenti periodi di degenza ospedaliera, sia isolati ottenuti da materiali clinici diversi. Di questi campioni, 10 isolati sono stati ottenuti da vari campioni clinici ospedalieri e 12 isolati da tampone rettale (Tabella 1).

Dati di isolamento				
Isolato	**Mese/Anno isolamento**	**Campione**	**Reparto**	**Sesso/Anno**
CP-Ec1	Ago/2015	Cute	Pediatria	M/2012
CP-Ec2	Ago/2015	Urine	Medicina Interna	F/1939
CP-Ec3	Nov/2015	Tampone rettale	Urologia	M/1931
CP-Ec4	Dic/2015	Tampone uretrale	Pediatria	M/2012
CP-Ec5	Dic/2015	Aspirato bronchiale	Medicina Interna	M/1945
CP-Ec6	Mag/2016	Tampone rettale	Medicina Interna	M/1945
CP-Ec7	Gen/2017	Sangue da CVC	Pronto soccorso	M/1994
CP-Ec8	Giu/2017	Aspirato tracheale	Malattie Infettive	M/1994
CP-Ec9	Ott/2017	Aspirato bronchiale	Medicina Interna	M/1994
CP-Ec10	Gen/2018	Tampone rettale	Neurochirurgia	M/1961
CP-Ec11	Feb/2018	Tampone rettale	Terapia Intensiva	M/1937
CP-Ec12	Mar/2018	Aspirato bronchiale	Terapia Intensiva	M/1940
CP-Ec13	Mar/2018	Tampone rettale	Neurochirurgia	F/1966
CP-Ec14	Mar/2018	Tampone rettale	Neurochirurgia	M/1956
CP-Ec15	Apr/2018	Tampone rettale	Neurochirurgia	M/1958
CP-Ec16	Apr/2018	Aspirato tracheale	Residenza Sanitaria Ass.	M/1994
CP-Ec17	Mag/2018	Tampone rettale	Gastroenterologia	M/1957
CP-Ec18	Set/2018	Tampone rettale	Terapia Intensiva	F/1948
CP-Ec19	Ott/2018	Tampone rettale	Neurochirurgia	F/1948
CP-Ec20	Nov/2018	Tampone vaginale	Ostetricia e Ginecologia	F/1980
CP-Ec21	Nov/2018	Tampone rettale	Terapia Intensiva	F/1947
CP-Ec22	Dic/2018	Tampone rettale	Terapia Intensiva	F/1939

Tabella 1 *– Dati di isolamento dei ceppi di E. coli raccolti nel periodo 08/2015- 12/2018.*

Per tutti i ceppi si è proceduto ad un nuovo percorso di isolamento in coltura pura e conferma dell'identificazione a livello di specie sia mediante test fenotipici che molecolari. In particolare, per l'identificazione biochimica è stato utilizzato il sistema API 20E (bioMèrieux), un sistema standardizzato di gallerie miniaturizzate, che permette l'identificazione di *Enterobacteriaceae* e bacilli Gram-negativi non esigenti. Ciascuna galleria contiene un substrato disidratato per evidenziare la fermentazione di zuccheri o la produzione di enzimi di catene metaboliche. La sospensione batterica standardizzata viene aggiunta per la reidratazione dei substrati. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione si traducono in viraggi colorati spontanei o rivelati in seguito all'aggiunta di specifici reattivi. La lettura di queste reazioni (positiva/negativa) viene registrata su una apposita tabella che permette di ottenere un profilo numerico; tale profilo numerico permette l'identificazione della specie attraverso il confronto con un software di identificazione.

Per la conservazione a lungo termine dei campioni e per tutte le analisi successive, le colture pure sono state sospese in terreno Brain Heart Infusion Broth (BH) con l'aggiunta del 20% di glicerolo e mantenute a -70°C fino al momento dell'uso.

Figura 1 *– Esempio di galleria API20E. a) test negativi; b) test positivi.*

3.2 - Terreni di coltura e sostanze chimiche utilizzate

Per la crescita dei ceppi di *E. coli* sono stati utilizzati il terreno nutritivo non selettivo Tryptic Soy Agar (TSA) e il terreno selettivo e differenziale Mac Conkey Agar (MC); quest'ultimo in particolare è il terreno di elezione per l'isolamento e l'identificazione dei bacilli Gram-negativi. In questo studio entrambi i terreni TSA e MC sono stati usati sia in formulazione base che addizionati con 0.125 mg/l di ertapenem o meropenem.

Per una rapida identificazione colturale è stato utilizzato il Chromatic CRE Agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, TE), un terreno cromogenico adeguato per la ricerca e la discriminazione di diverse specie della famiglia *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi. Oltre ad un equilibrato contenuto di sostanze per favorire la rapida crescita dei batteri, il terreno è caratterizzato da una miscela cromogenica e di agenti selettivi che facilitano l'identificazione dei batteri sulla base del colore e della morfologia, inibendo la maggior parte dei microrganismi non appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Per la determinazione della sensibilità agli antibiotici è stato utilizzato Mueller-Hinton Agar (MHA). Si tratta di un terreno di coltura non selettivo e non differenziale, con specifiche caratteristiche: la percentuale ridotta di agar permette una rapida diffusione radiale delle molecole antibiotiche, l'amido presente ha lo scopo di assorbire eventuali tossine prodotte dai ceppi batterici (così da evitare interferenze con le molecole antibiotiche) e la miscela di nutrienti (estratto di carne bovina e idrolizzato di acido di caseina) è adeguata alla crescita della maggior parte delle specie batteriche. Per la sospensione delle colture batteriche e la preparazione dell'inoculo standardizzato è stata utilizzata la variante liquida, Mueller-Hinton Broth (MHB). Il Mueller Hinton II Broth (CAMHB), che differisce dal precedente per un contenuto calibrato di ioni calcio e magnesio, nonché un basso contenuto di timina e timidina, è stato utilizzato in tutte le procedure di microdiluizione in brodo (CLSI, 2015).

3.3 – Principali soluzioni utilizzate

Tris-Acetato- EDTA (TAE)

Soluzione tampone principalmente utilizzata in laboratorio per la separazione di molecole di DNA o RNA lineari richiedenti brevi procedure di elettroforesi. La piccola percentuale di EDTA presente ha azione chelante nei confronti di cationi divalenti in particolare il magnesio, rendendolo indisponibile come cofattore per l'azione degli enzimi nucleasi. Rispetto al TBE (*tris-borato-EDTA*), utilizzato invece per procedure di separazione più lunghe (PFGE), ha una minor capacità tamponante e tende a surriscaldarsi ed esaurirsi in fretta, ma allo stesso tempo permette una separazione più rapida delle molecole ottenute da tecniche di PCR (*polymerase-chain-reaction*). La soluzione di lavoro 1X viene preparata al momento a partire da una soluzione stock 50X diluendo in maniera opportuna con acqua distillata.

Preparazione: ***TAE-Soluzione Stock (50X)***

- tris base (1 M) 242g
- EDTA pH 8 (0,5M) 100ml
- Acido acetico glaciale 57,1 ml
- H_20 ultrapura portare a 1L

Tris-borato-EDTA (TBE)

Soluzione tampone di elezione per le procedure di PFGE. Rispetto al buffer TAE, il TBE ha una maggiore capacità tamponante, fornisce una migliore risoluzione dei frammenti di DNA ed inoltre ha azione inibente sulla DNA ligasi. Il TBE viene preparato al momento dell'uso alla concentrazione di lavoro 0,5X a partire da una soluzione stock 10X.

Preparazione: ***TBE-Soluzione Stock (10X)***

- Tris base (1 M) 108 g
- EDTA pH 8 (20 mM) 9,3 g
- Acido Borico (1 M) 55 g
- H_20 ultrapura portare a 1L

EDTA- ***Soluzione Stock (0,5M) pH 8,0***

- Disodio EDTA $2H_20$ 186 g
- NaOH 20 g
- H_2O ultrapura portare a 1L

3.4 - Procedure di analisi fenotipica

Antibiogramma: procedura operativa e interpretazione dei risultati

Sistema di valutazione qualitativo della sensibilità agli antibiotici da parte dei ceppi in esame che si ottiene mediante la procedura di diffusione in agar, secondo le direttive proposte dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2015).

A seguito di isolamento di colture pure dei ceppi in esame, una colonia viene seminata in terreno selettivo MC e fatta crescere overnight a 35°C ± 2°C. Al mattino, le colture ottenute vengono sospese in MHB e opportunamente diluite al fine di ottenere una densità ottica (OD misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 625 nm, OD_{625}) di 0.1, corrispondente a circa 1 x 10^8 Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml). L'inoculo così standardizzato, con l'ausilio di un tampone sterile, viene poi distribuito in modo uniforme sull'intera superficie di piastre di MHA. Subito dopo vengono applicati sterilmente i dischetti di antibiotici da saggiare sulla superficie della piastra, facendo attenzione a posizionarli ad una distanza tale da evitare fenomeni di interferenza. Successivamente le piastre vengono incubate in aerobiosi a 35°C ± 2°C per 18-24 h.

In tutti gli esperimenti la corretta esecuzione della procedura viene monitorata saggiando in parallelo il ceppo di controllo *E. coli* ATCC 25922 (QC strain).

Gli antibiotici saggiati sono stati: amoxicillina/acido clavulanico (20/10 µg) (AMC), aztreonam (30 µg) (ATM), ceftazidime (30 µg) (CAZ), cefotaxime (30 µg) (CTX), cefepime (30 µg) (FEP), imipenem (10 µg) (IPM), meropenem (10 µg) (MEM), ertapenem (10 µg) (ETP), ciprofloxacina (5 µg) (CIP), gentamicina (10 µg) (CN), cloramfenicolo (30 µg) (C) e trimetoprim-sulfametoxazolo (25 µg) (SXT).

Al termine dell'incubazione, otterremo delle piastre che presentano una crescita omogenea nelle aree distali, e aloni di inibizione nei pressi dei dischetti antibiotici: la misurazione di tali diametri e la sua successiva comparazione con i valori di riferimento di EUCAST (EUCAST, 2019) riportati nella Tabella 2 permettono di definire per ogni antibiotico la sensibilità (S), la resistenza (R).

ANTIBIOTICO	Concentrazione dischetto (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
		S	R
Amoxicillina + Acido Clavulanico	20 + 10	≥19	<19
Aztreonam	30	≥26	<21
Cefepime	30	≥27	<24
Cefotaxime	30	≥20	<19
Ceftazidime	30	≥22	<19
Ciprofloxacina	5	≥25	<22
Cloramfenicolo	30	≥17	<17
Ertapenem	10	≥25	<25
Imipenem	10	≥ 22	< 16
Meropenem	10	≥ 22	< 16
Gentamicina	10	≥17	<17
Trimetoprim-Sulfametoxazolo	25	≥14	<11

Tabella 2 *– Valori di riferimento per l'interpretazione degli aloni di inibizione per Enterobacteriaceae (EUCAST, 2019).*

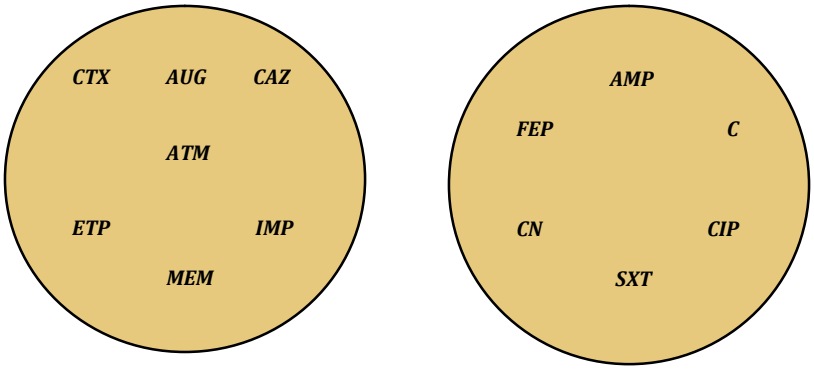

Figura 2 *– Esempio di disposizione dei dischetti antibiotici. Per saggiare tutti gli antibiotici è stato necessario utilizzare due piastre di MH per ogni ceppo. Nella piastra a sinistrai dischetti di antibiotici CTX, AUG, CAZ, e ATM sono stati posizionati reciprocamente più vicini per saggiare l'eventuale sinergia tra essi.*

Determinazione fenotipica di produzione di ESBL

La putativa produzione di ESBL da parte dei ceppi in esame è stata verificata mediante un test fenotipico di sinergia tra cefalosporine di III generazione ed acido clavulanico, che rappresenta l'inibitore di queste β-lattamasi. In particolare, per il test sono stati utilizzati dischetti contenenti cefotaxime e ceftazidime, e un dischetto di aztreonam (monobattami) posizionati vicino ad un dischetto di amoxicillina/acido clavulanico ad una distanza reciproca di 15 mm. Il risultato positivo era evidenziato da un aumento dell'alone di inibizione attorno ad uno dei tre dischetti nella direzione del dischetto contenente acido clavulanico (Figura 3). Il ceppo *K. pneumoniae* ATCC 700663 è stato usato come controllo positivo per la produzione di ESBL.

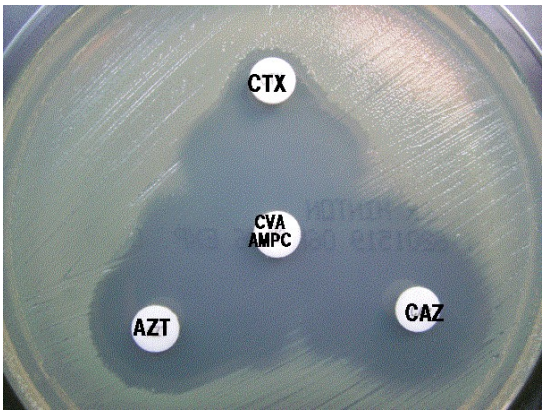

Figura 3 - *test di produzione di ESBL da parte di ATCC 700663. Si noti l'ampliamento degli aloni di inibizione di CTX, CAZ e AZT in prossimità del dischetto contenente l'acido clavulanico (CVA-AMPC).*

Microdiluizione in brodo

Procedura che consente di ottenere la **Minima Concentrazione Inibente** (MIC), ossia la quantità più bassa di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica. La procedura di microdiluizione in brodo è la procedura di riferimento internazionale ed è stata utilizzata in questo studio per ottenere le MIC dei tre carbapenemi IPM, ETP e MEM, utilizzando, anche in questo caso, i *breakpoint* forniti dal comitato EUCAST (EUCAST, 2019)(Tabella 3).

ANTIBIOTICO	MIC (µg/ml)	
	S	R
Imipenem (IMP)	≤ 2	> 4
Ertapenem (ETP)	≤ 0.5	>0.5
Meropenem (MEM)	≤ 2	> 8

Tabella 3 *– Valori di riferimento per l'interpretazione della minima concentrazione inibente per Enterobacteriaceae (EUCAST, 2019).*

Procedura dettagliata

- Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 50µl di CAMHB in tutti i pozzetti di una piastra microtiter da 96 pozzetti escludendo la prima colonna.
- Partendo da una soluzione madre di antibiotico, diluire fino a ottenere una concentrazione pari al doppio della concentrazione massima che si desidera saggiare per il ceppo. Dispensare 100µl di antibiotico sui pozzetti lasciati vuoti della prima colonna.
- Utilizzando la multicanale, eseguire la diluizione scalare dell'antibiotico prelevando 50µl di antibiotico dalla prima colonna e proseguire dispensando e prelevando la medesima aliquota per tutte le colonne successive, eccetto l'ultima che rappresenta il controllo di crescita del ceppo in assenza di antibiotico (C+).

- Preparare una sospensione del ceppo in esame in CAMHB, misurare la densità ottica e proseguire con eventuali diluizioni fino ad ottenere una DO (misurata alla lunghezza d'onda di 625 nm) di 0.1.
- Eseguire una diluizione 1:100 della sospensione ottenuta. Designare per ogni ceppo una riga della piastra, e in questa dispensare 50µl della sospensione diluita. In questo modo si otterrà in ciascun pozzetto della microtiter la concentrazione finale richiesta di 5×10^5 UFC/ml.
- Incubare in termostato in aerobiosi a 35°C ± 2°C per 18-24h.

Al termine dell'incubazione, sarà possibile determinare il valore della MIC per ogni campione che sarà definito come la più bassa concentrazione di antibiotico in cui non si osserva crescita visibile.

Anche per questa procedura, proprio come per l'antibiogramma, è fondamentale utilizzare un QC strain (in tal caso *E. coli* ATCC 25922) per monitorarne la corretta esecuzione: se i risultati del QC rientrano nei range di validità, tutti i risultati delle nostre MIC potranno essere considerati validi.

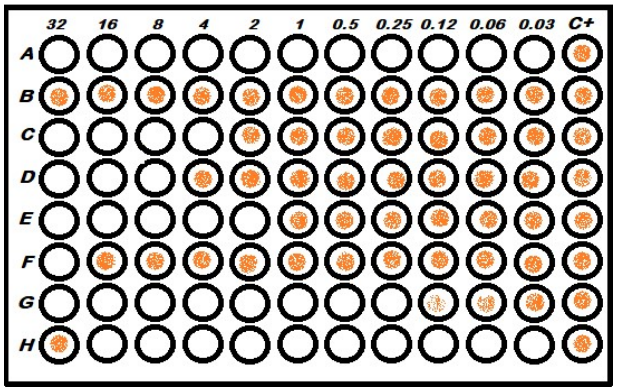

Figura 4 *– esempio di MIC per imipenem: per ogni lettera è stato seminato un ceppo diverso, per ogni colonna una diversa concentrazione di antibiotico. Colonna del C+ (antibiotico non presente) attesta avvenuta crescita dei ceppi.*

A- ceppo S, MIC≤ 0.03 ;
B- ceppo R MIC>32;
C- ceppo I MIC=4;
D- ceppo R MIC=8
E- ceppo S MIC=2
F- ceppo R MIC=32
G- ceppo S MIC=0.25
H- artefatto: MIC non considerabile

3.5 - Procedure di analisi genotipica

Estrazione DNA genomico

L'estrazione di DNA genomico purificato è il primo step per tutte le analisi molecolari. Si tratta di una procedura molto delicata volta alla separazione del materiale nucleico batterico dalle altre componenti cellulari, preservando nel contempo l'integrità dello stesso, molto fragile e sensibile ad agenti esterni. Esistono varie metodiche di estrazione, che hanno come comun denominatore il passaggio attraverso 4 principali fasi:

1. la lisi cellulare, ossia lo sfaldamento della membrana plasmatica e della parete batterica ad opera di detergenti;
2. l' inattivazione delle nucleasi, che andrebbero a idrolizzare il DNA una volta libero nell'ambiente, ad opera di enzimi;
3. la purificazione, ossia la rimozione di sostanze proteiche contaminanti mediata da lavaggi con alcool;
4. la precipitazione, ossia il recupero finale degli acidi nucleici in forma solida mediato da lavaggi in sostanze come alcol etilico o isopropanolo.

Il DNA totale dei ceppi in esame è stato ottenuto mediante il sistema di estrazione e purificazione GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich St Louis, Mo.). Si procedeva rispettando il seguente protocollo fornito dalla ditta produttrice, con due modifiche nella fase di lisi cellulare: (i) l'aggiunta di 5 µl di una soluzione di mutanolisina (500 U/ml) (Sigma) e (ii) aumentando il tempo di incubazione a 3h. Il kit è basato sulla proprietà delle matrici di silicio di adsorbire il DNA, effettuando un estrazione su colonnina. Di seguito il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

- Centrifugare 1,5ml di coltura batterica cresciuta overnight a 12000-16000g per 2';
- Eliminare il sovranatante, risospendere il pellet in 180µl di Lysis Solution T (Buffer STL per GenElute Mammalian Genomic DNA Kit);
- Aggiungere 20µl di RNase A Solution, passare al vortex e incubare a temperatura ambiente per 2';
- Aggiungere 20µl di una soluzione di Proteinasi K, passare al vortex e incubare a 55°C per 30';
- Aggiungere 200µl di Lysis Solution C, vortexare per circa 15'' e incubare per 10' a 55°C;
- Inserire la colonnina fornita in una provetta eppendorf da 2ml, aggiungere 500µl di Column Preparation Solution, centrifugare a 12000g per 1'; eliminare l'eluito;
- Aggiungere 200µl di etanolo assoluto al lisato, vortexare per 5-10'';
- Trasferire il lisato nella colonnina preparata precedentemente e centrifugare a 6500g per 1';
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf, aggiungere 500µl di Wash Solution 1 e centrifugare a 6500g per 1'; eliminare l'eluito;
- Aggiungere 500µl di Wash Solution e centrifugare alla massima velocità (12000-16000g) per 3'; eliminare l'eluito;
- Centrifugare nuovamente la colonnina per 1' alla massima velocità;
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf e aggiungere 200µl di Eluition Solution; incubare per 5' a temperatura ambiente e centrifugare a 6500g per 1';
- Ripetere la procedura di eluizione; conservare l'eluito finale (ca. 400µl), contenente il DNA genomico purificato, a – 20°C.

Tecnica di PCR per le indagini molecolari

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica di amplificazione genica a catena che permette di ottenere in modo molto rapido, mediante la ciclica variazione della temperatura cui vengono sottoposti i campioni, milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico di partenza.

Il principio alla basa di questa tecnica sta nell'utilizzo della DNA Polimerasi per la ricostruzione artificiale del processo di sintesi genica a partire da un filamento di DNA, che fa da stampo per la costruzione del filamento complementare, costruito nucleotide per nucleotide. Per la procedura è necessario disporre di una TAQ Polimerasi termostabile, come la DREAM TAQ da noi usata (https://www.thermofisher.com), predisporre una miscela contenente i vari elementi necessari e sottoporre i campioni ad un rapido succedersi di cicli di amplificazione, durante i quali si alternano tre diverse temperature, e grazie alle quali durante ogni ciclo il numero di nuove molecole di DNA duplica.

Lo strumento di elezione per questa metodica è il termociclatore, un apparecchio che, utilizzando l'effetto Peltier, permette la rapida variazione di temperatura della "cella di peltier" mediante semplice inversione della direzione della corrente elettrica che la attraversa, metodo molto più rapido per ottenere un veloce raffreddamento a confronto dei classici metodi conosciuti, permettendo così il rapido succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature; il numero di nuove molecole di DNA aumenta al succedersi di ogni ciclo.

Preparazione della ***MIX di PCR***

COMPONENTE	Conc. Iniziale	Conc. Finale	Volume Finale
Acqua milliQ sterile			41.35 µL
Buffer	10X	1X	5 µL
dNTPs	10000 µM	200 µM	1 µL
Primers	100 µM	0.5 µM	0.25 µL
Dream Taq	5U/ µL	1U/ µL	0.25 µL
DNA			2 µL

Tabella 4 *– Composizione standard della mix di PCR, Vol. finale 50 µL.*

Le diverse ***fasi della PCR*** sono:

- **Denaturazione** (95°C; 3-5'), nella quale i filamenti di DNA a doppia elica, sottoposti a riscaldamento, si separano in filamenti singoli.

- **Annealing** (30'' - 1'), nella quale avviene l'appaiamento dei primers alle sequenze di DNA a singola elica complementari. La temperatura di annealing (T_A) dipende da quella di melting (T_M), cioè la temperatura alla quale IL 50% dei nucleotidi del primer si lega alla sequenza di DNA target, alla quale vengono detratti dai 2 ai 5°C; in caso di primers con T_M diverse, si utilizza quella più bassa.

La temperatura di melting di un dato primer può essere calcolata tramite la seguente formula:

$$T_M = 4\,(G + C) + 2\,(A + T)\ °C$$

- **Estensione** (72°C), nella quale avviene l'allungamento dei primer ad opera della DNA polimerasi e la sintesi del nuovo filamento. La durata di tale fase viene stabilita sulla base della grandezza della sequenza target, tenendo conto della capacità di sintesi della polimerasi usata (*bp/min* - Per definizione la Dream Taq polimerasi sintetizza 1 kb/minuto).

Queste tre fasi si ripetono ciclicamente per un numero di volte scelto proporzionalmente alla quantità di DNA ottenuto dalle procedure di estrazione, generalmente un risultato soddisfacente è ottenibile entro un range di 30-35 cicli.

Nel nostro studio, la PCR tradizionale è stata utilizzata per la ricerca delle ß-lattamasi *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*CMY, utilizzando i primers di letteratura (Pagani L, 2003; Dallenne C, 2010).

Primers	Sequenza nucleotidica	Gene	Taglia	Bibliografia
CTX-M1 **CTX-M2**	ATGTGCAGYACCAGTAARGT TGGGTRAARTARGTSACCAGA	blaCTX-M	593 bp	Pagani 2003
TEM-F **TEM-R**	ATGAGTATTCAACATTTCCG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	blaTEM	861 bp	mugnaioli et Al. 2006
SHV-F **SHV-R**	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	blaSHV	713 bp	Sáenz et al. 2004
CMY-F **CMY-R**	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG	blaCMY	1138 bp	Dierikx 2010

Tabella 5 *– Elenco di primer usati e relative caratteristiche.*

Condizioni di amplificazione:

CTX-M:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 7'
- 35 cicli di denaturazione a 94°C per 50'', annealing a 50°C per 40'' e polimerizzazione a 72°C per 1'
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5'

TEM:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 5'
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1', annealing a 53-55°C per 1' e polimerizzazione a 72°C per 1'
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5'

SHV:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 5'
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1', annealing a 58°C per 1' e polimerizzazione a 72°C per 1'
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5'

CMY:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 5'
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1', annealing a 63°C per 1' e polimerizzazione a 72°C per 1'
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5'

PCR Multiplex

Variante della PCR tradizionale, consiste nell'utilizzo di più coppie di primer contemporaneamente. Di fatto migliora notevolmente l'efficienza delle analisi di screening genetico permettendo una riduzione di tempi e costi mantenendo la consueta efficacia. Utilizzando i primer ed i criteri stabiliti da Poirel et al. (Poirel L, 2011), è stato possibile rilevare i geni delle principali classi di carbapenemasi (*blaIMP*, *blaVIM, blaNDM, blaKPC, blaOXA-48*) (Tabella 6).

Primer	Sequenza nucleotidica	Gene	Taglia
KPC-F **KPC-R**	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	*blaKPC*	798 bp
IMP-F **IMP-R**	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAYAAAACAACCACC	*blaIMP*	232 bp
VIM-F **VIM-R**	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	*blaVIM*	390 bp
OXA-F **OXA-R**	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	*blaOXA-48*	438 bp
NDM-F **NDM-R**	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	*blaNDM*	621 bp

Tabella 6 *– elenco dei primer utilizzati e relative caratteristiche.*

Il programma di amplificazione prevedeva una denaturazione iniziale a 94°C per 10', 36 cicli di denaturazione (94°C, 30''), annealing (52°C, 40'') e polimerizzazione (72°C, 50'') e un ciclo di allungamento finale a 72°C di 5'.

L'elenco dei componenti utilizzati per l'amplificazione, le concentrazioni finali e il mix di reazione sono riportati di seguito:

MPONENTE	Conc. Iniziale	Conc. Finale	Volume Finale
Acqua milliQ sterile	-	-	41.25 µL
Buffer	10X	1X	5 µL
dNTPs	10000 µM	200 µM	1 µL
Primers	100 µM	0.5 µM	0.25 µL
Dream Taq	5U/ µL	1U/ µL	0.25 µL
DNA	-	-	2 µL

Tabella 7 *– Composizione della mix di PCR MULTIPLEX, Vol. finale 50 µL.*

Elettroforesi in gel di agarosio

Ottenuti i prodotti di amplificazione, questi sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% in Tris Acetato EDTA (TAE) e colorati con il colorante fluorescente intercalante del DNA GelGreen (Società Italiana Chimici).

L'elettroforesi su gel è una tecnica di separazione che sfrutta l'applicazione di un campo elettrico per spingere il DNA, carico negativamente, a migrare dal catodo verso l'anodo attraversando un gel. Questo, grazie alla sua struttura porosa, funge da setaccio molecolare e ostacola il passaggio delle molecole di DNA di grandi dimensioni, favorendo la corsa di quelle più piccole e cariche.

Procedura

Preparazione del gel:

Preparare gel (1%) aggiungendo 1g di agarosio a 100ml di TAE 1X. Aggiungere 300µl di GelGreen. Versare e lasciare solidificare il gel in apposito sistema dotato di pettine per la formazione dei pozzetti.

Preparazione dei campioni

Per ogni campione si prelevano 10µl cui si addizionano 2µl di *lodingdye*, composto contenente blu di bromofenolo, il quale rende visibile il fronte della corsa e permette quindi di verificare in ogni momento la migrazione, e glicerolo, che, conferendo densità al prodotto di amplificazione, permette di evitare la dispersione del DNA durante il caricamento del gel.

Assemblaggio della camera di elettroforesi

A seguito di solidificazione del gel, si rimuove dallo stampo e lo si posiziona all'interno della camera di elettroforesi, riempendola fino a copertura del gel con tampone di corsa TAE 1X. Rimuovere delicatamente il pettine e caricare i campioni. Aggiungere in ogni corsa nell'ultimo pozzetto 5µl di marker 100bp plus (range 100-3000 bp), un marcatore molecolare costituito da frammenti di DNA di peso molecolare noto, servirà come standard di comparazione per gli amplificati ottenuti.

Corsa Elettroforetica

Attivare il circuito applicando un voltaggio costante di 90V; attendere circa 30-40 minuti osservando periodicamente che il fronte di migrazione non superi i confini del gel

Rilevazione

Al termine della corsa, prelevare il gel dalla camera elettroforetica e posizionarlo sul transilluminatore UV. Questi, eccitando la fluorescenza del colorante intercalante, permette l'osservazione di presenza e qualità delle bande di DNA ottenute.

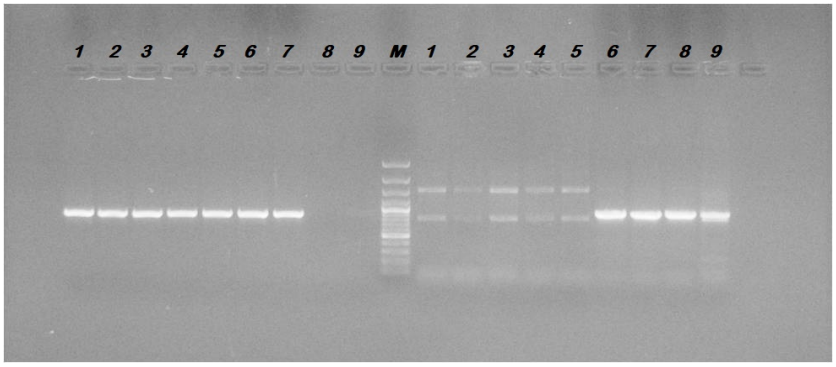

Figura 5 *– esempio di rivelazione di corsa elettroforetica per i geni blaTEM (sinistra) e blaSHV (destra). Al centro indicato con la lettera "M" il marker 100 bp plus.*

3.6 - Metodiche di tipizzazione

ERIC PCR

La tecnica di tipizzazione ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) consiste nell'amplificare delle sequenze non codificanti intergeniche presenti nei genomi di batteri della famiglia *Enterobacteriaceae.*

Tali sequenze sono palindromi imperfetti con ampiezza pari a 126 bp e ripetuti in varie copie all'interno del genoma batterico, caratterizzati da una ripetizione centrale invertita altamente conservata e presente in pressoché tutte le *Enterobacteriaceae*.

La loro scoperta ha permesso di sviluppare delle tecniche rapide di *fingerprinting* genomico. La tecnica prevede l'uso di primers specifici (Versalovic 1991) che consentono, previa amplificazione e separazione elettroforetica convenzionale dei frammenti ottenuti, di ottenere una mappatura genica del campione in esame in poche ore. In particolare, le sequenze ERIC delimitano un'area con un nucleo centrale, costituito dalla ripetizione invertita, e proprio dal centro di questa è possibile partire nel disegnare due oligonucleotidi, denominati ERIC1R e ERIC2, con orientamento opposto e di modo che le estremità 3' delle molecole siano dirette entrambe verso l'esterno dell'elemento ERIC. Utilizzando questi come primers in una reazione di amplificazione, questi si appaieranno in vari punti del genoma batterico, producendo come risultato un numero variabile di frammenti genomici di diversa dimensione.

In questo studio, la tecnica ERIC-PCR è stata utilizzata per genotipizzare tutti i ceppi di *E. coli* in esame; i risultati ottenuti sono poi stati confrontati con i risultati ottenuti dalle altre tecniche di tipizzazione molecolare, in particolare la MLST.

Primers	Sequenza nucleotidica	
ERIC-CONSENSUS	**5'** GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG **3'**	
ERIC 1R	**5'** ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC **3'**	
ERIC 2		**5'** TTCATTCACTGACCCCACTCGC **3'**

Tabella 8 *– Sequenza nucleotidica della regione consenso ERIC e dei due primer, ERIC 1R e ERIC 2.*

Per una corretta interpretazione dei risultati e al fine di confrontare i profili ottenuti è fondamentale utilizzare in ogni saggio tutti i campioni che si desidera analizzare, poiché il test risente di una discreta variabilità in funzione sia della fase di amplificazione che della successiva elettroforesi.

Procedura

Seguendo i principi di una classica PCR, a seguito di estrazione del DNA dei ceppi di interesse, si prosegue mediante la preparazione di una mix di PCR. In questa seduta è stata utilizzata una diversa polimerasi (Takara Ex Taq), che ha la caratteristica di sopportare tempi di allungamento più lunghi, dando origine ad amplificati più grandi e garantire un basso indice mutageno.

MIX DI PCR

COMPONENTE	Conc. Iniziale	Conc. Finale	Volume Finale
Acqua milliQ sterile			37.36 µL
Buffer	10X	1X	5µL
dNTPs	2,5mM	200µM	4µL
Primer Eric 1R	100µM	0.2µM	0.2µL
Primer Eric 2	100µM	0.2µM	0.2µL
Ex Taq	5U/µL	1.2U/µL	0.24µL
DNA			3µL

Tabella 9 *– Composizione della mix per PCR ERIC, Vol. finale 50 µL.*

Condizioni di pcr

- Denaturazione iniziale a 94°C per 3'
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1', annealing a 40°C per 1' e polimerizzazione a 72°C per 2'
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 10'

Elettroforesi su gel di agarosio.

Terminata la reazione di amplificazione, i frammenti vanno separati utilizzando un gel di agarosio all'1,5% al fine di ottenere una migliore risoluzione. L'elettroforesi deve essere condotta per almeno 1 ora a basso voltaggio (60 V) prima di visualizzare le bande di DNA mediante transilluminatore UV.

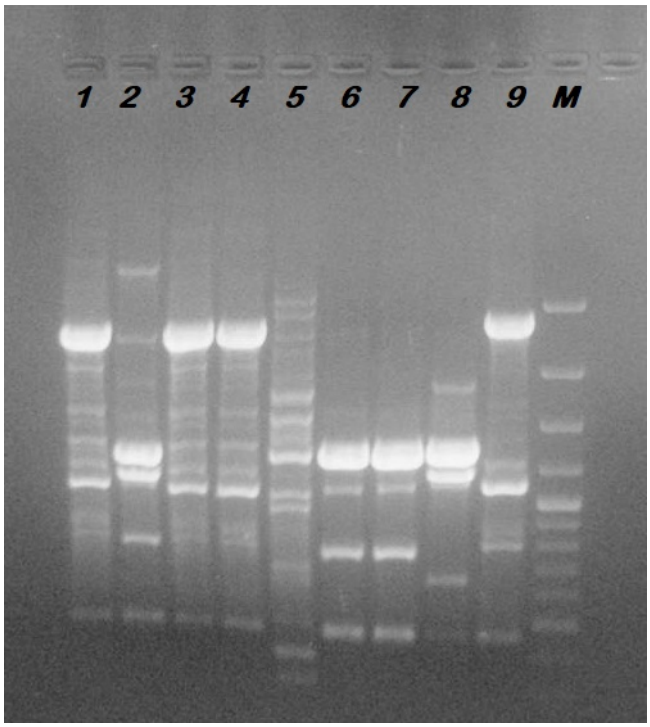

Figura 6 *– esempio di rivelazione di corsa elettroforetica per ERIC-PCR di nove campioni. A destra è stato posizionato il marker con frammenti a grandezza nota per orientarsi sull'ampiezza dei frammenti ottenuti. Dall'osservazione dell'immagine si può notare come alcuni ceppi mostrino un profilo ad alta correlazione e siano presenti 3 diversi clusters di associazione.*

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): digestione enzimatica con XbaI

Gold standard per la tipizzazione genotipica di batteri patogeni, la tecnica di digestione mediante l'enzima di restrizione *XbaI*, seguita da elettroforesi in campo pulsato (PFGE) consente di ottenere un cosiddetto "profilo di restrizione" del genoma di un ceppo batterico, utilizzabile per mettere a confronto ceppi diversi, valutarne il grado di correlazione e permetterne l'associazione in clusters.

Gli enzimi di restrizione sono un tipo particolare di endonucleasi batteriche in grado di digerire in maniera specifica e riproducibile DNA esogeno, producendo frammenti di diversa taglia molecolare (profilo di restrizione) in ciascun campione di DNA genomico in esame. I profili di restrizione ottenuti possono quindi essere risolti mediante elettroforesi in campo pulsato e successivamente confrontati.

Gli esperimenti sono stati condotti secondo quanto riportato da Hunter et al. (Hunter S et al., 2005) apportando qualche modifica al protocollo. L'interpretazione del risultato e della relazione genetica tra i diversi genomi sono state determinate mediante criteri di letteratura (Tenover FC et al., 1995) ed analisi informatica. In base al confronto tra i profili di restrizione (pulsotipi) i genomi possono essere distinti in identici, strettamente correlati, probabilmente correlati e distinti.

Preparazione delle PLUG - Preparare precedentemente una colture O/N dei ceppi batterici di interesse. Ottenere una sospensione batterica standardizzata (OD625 = 0,570-0,820), prelevarne un'aliquota e mescolarla con un pari volume di low-melting-point agarose all'1,6% (Bio-Rad, Hercules, California, USA), introdurla prima che solidifichi in appositi stampi chiamati plug-mold per la formazione delle plugs.

Lisi cellulare **-** Una volta solidificate in frigorifero, incubare in 5ml di tampone di lisi (contenente lisozima 1mg/ml e proteinasi K 20µg/ml). per 24h a 54°C.

***Purificazione delle plug* -** Si lavano le plug per eliminare i residui di proteine, lisozima e proteinasi K. Si rimuove il tampone di lisi facendo attenzione a non perdere le PLUG e si sostituisce tre volte con acqua ultrapura a 54°C e tre volte con buffer TE a 54°C. I sei lavaggi vanno eseguiti in leggera agitazione. A questo punto le plug possono essere conservate in TE in frigorifero per molto tempo senza che si degradino.

***Digestione enzimatica* -** Si raccoglie metà PLUG (contiene una quantità sufficiente di DNA, una plug intera conterrebbe materiale superfluo) e si digerisce *overnight a 37°C con una soluzione di digestione composta da* 40 U di XbaI (Sigma-Aldrich), il suo buffer associato e acqua ultrapura nucleasi free. Al mattino, bloccare la digestione aggiungendo alle plug 1ml di EDTA 0.5 M.

***Caricamento del pettine* -** Ciascuna plug viene posta su un dente del pettine utilizzando una piccola aliquota di low-melting-point agarose all'1%. In prima posizione inserire il marker Lambda PFGE Ladder (New England, Biolabs) che consentirà di determinare i pesi molecolari di ciascuna banda ottenuta.

***Preparazione del gel* -** Prepare un gel all'1% aggiungendo 1,2g di AGAR Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) a 120ml di buffer, sciogliere al microonde. Assemblare l'apposita camera di solidificazione, posizionare correttamente il pettine facendo attenzione che sia inclinato, utilizzare una bolla per verificare di essere in piano e versare il gel. Attendere un'iniziale solidificazione per poi trasferire lo stampo in frigorifero. Rimuovere il gel del tutto induritosi dallo stampo e introdurlo nella PFGE. Riempire la camera elettroforetica con circa 2L di buffer TBE 0,5% fino a coprire il gel.

***Avvio della corsa* -** Impostare la PFGE a 14°C, 18h, 6V/cm, initial switch time di 2,16'', final switch time di 54,17'' e ramping factor lineare.

***Colorazione e rilevazione* -** A corsa ultimata prelevare il gel e colorarlo per 30' in Bromuro di Etidio (0,5μg/ml). Lavare 15' in acqua ultrapura ed infine fotografare al transilluminatore UV.

Soluzioni utilizzate

Lysis solution

- 1 M NaCl
- 100 mM EDTA (pH 8)
- 6 mM Tris-HCl
- 0,5% Brij 58
- 0,5% deoxycholate

Digestion buffer

- 0,5 M EDTA (pH 8)
- 1% N-lauroyl sarcosine (pH 8)
- 0,5% N-lauroyl sarcosine (pH 7.6)

TE buffer

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA (pH 8)
- TBE 10X
- 1 M Tris
- 1 M acido borico
- 20 mM EDTA (pH 8)

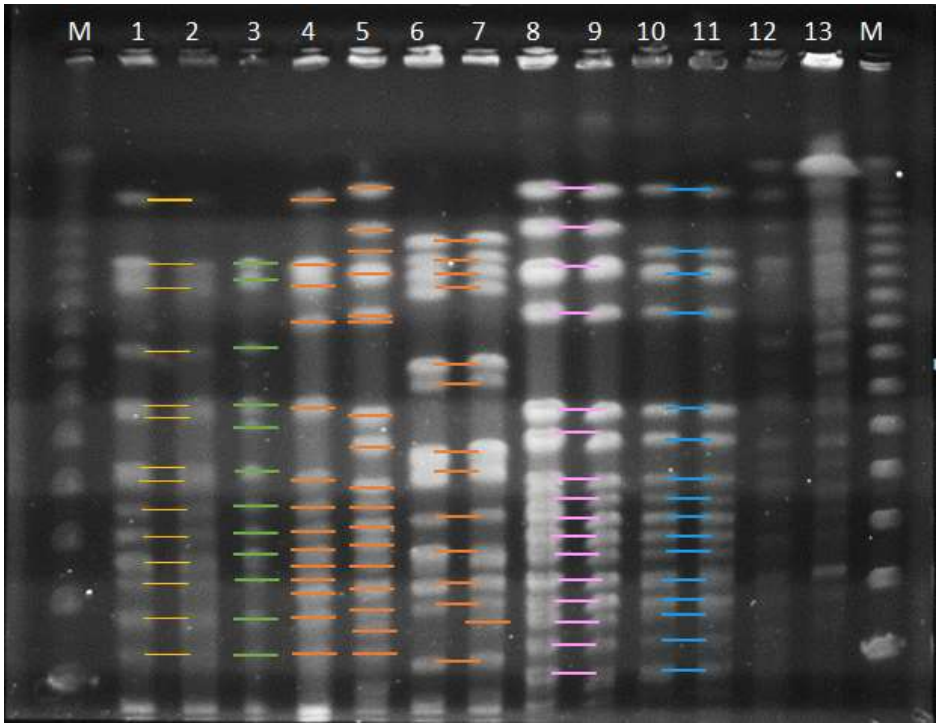

Figura 7 *– esempio di rivelazione di risultati di PFGE. Il Marker lambda PFGE ladder (*New England, Biolabs) è stato caricato in *prima e ultima posizione. I campioni di DNA in esame sono stati caricati vicini per migliorare l'analisi delle bande di restrizione, messe in evidenza da linee colorate dopo acquisizione digitale dell'immagine. Campioni con pulsotipo identico (linee 1, 2; linee 8, 9; linee 10, 11); campioni con profilo strettamente correlato (linee 6, 7); campioni con profilo probabilmente correlato (linee 4, 5); profili distinti (linee 3, 12, 13).*

Sequenziamento

Tutti i prodotti di amplificazione (geni *bla*, geni *house-keeping*) sono stati sequenziati per ottenere informazioni relative alle varianti di ciascuna carbapenemasi, ESBL e altri geni di ß-lattamasi, nonché per identificare gli alleli dei geni *house-keeping* per l'ottenimento dei *sequence types*.

Per il sequenziamento è stato utilizzato il sistema automatizzato ABI Prism basato sul metodo di Sanger. Esso si basa sull'incorporazione casuale, durante la polimerizzazione del filamento di DNA, di una miscela di nucleotidi modificati, i dideossinucleotididitrifosfato (ddNTPs), anche detti terminatori. Questi, non possedendo il gruppo ossidrilico al 3', impediscono alla DNA polimerasi di formare il legame fosfodiesterico col nucleotide successivo, interrompendo perciò l'allungamento della molecola. Al termine della reazione di pre-sequenziamento otterremo un prodotto costituito da molecole di DNA di varia lunghezza, ognuna terminante con un diverso ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTPeddCTP) marcato con uno specifico fluorocromo.

Nei sistemi automatizzati, queste reazioni sono seguite da elettroforesi capillare. Durante la corsa elettroforetica, le molecole ottenute vengono spinte a passare attraverso un sistema di capillari riempiti di un tampone di separazione, il quale permette in modo rapido ed efficiente di separare i frammenti. Questi vengono eccitati da una luce laser e rilevatori presenti al termine della corsa captano la lunghezza d'onda emessa e l'intensità di tale emissione, identificando in questo modo quale nucleotide è presente al termine del frammento. Integrando queste informazioni con dati riguardo grandezza e velocità elettroforetica delle varie molecole, il software ricostruisce la sequenza nucleotidica iniziale e offre in uscita un grafico con picchi di 4 diversi colori (uno per ogni nucleotide) con aree proporzionali all'intensità di emissione.

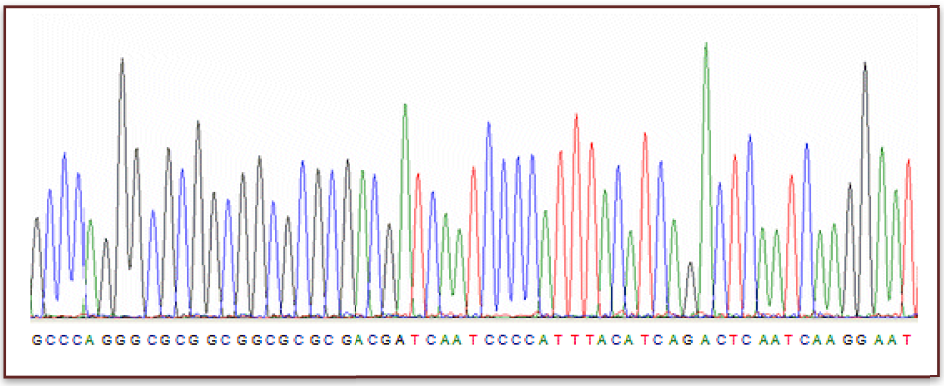

Figura 8– *esempio di elettroferogramma ottenuto con sistema di sequenziamento ABI Prism.*

4 - RISULTATI

Caratterizzazione degli isolati di *E. coli* carbapenemasi-produttori

Nel periodo analizzato (Agosto 2015-dicembre 2018) sono stati raccolti 22 isolati di *E. coli* non sensibili ai carbapenemi e produttori di carbapenemasi. Come primo dato generale, si evidenziava un aumento di isolamento di questa specie nell'ultimo anno, soprattutto da tamponi rettali, condizione che sembra riflettere l'aumento dei protocolli di sorveglianza del nostro ospedale per la prevenzione delle infezioni nosocomiali nei reparti più a rischio.

Combinando insieme diverse procedure di analisi fenotipiche (test di diffusione in agar, test di MIC, test di sinergia) e genotipiche (identificazione di carbapenemasi e altri geni *bla* mediante PCR e sequenziamento) è stato possibile ottenere e caratterizzare il resistoma dei 22 ceppi di *E. coli*. I risultati delle indagini e le considerazioni sono riportate di seguito.

L'analisi del resistoma indica che la maggior parte dei ceppi è pienamente resistente ai carbapenemi. In particolare tutti i ceppi sono resistenti all'ertapenem, mentre le resistenze nei confronti degli altri due carbapenemi sono più variabili. Tale differenza è presumibilmente associata con il tipo di carbapenemasi prodotta.

In base alla definizione di multiresistenza per *Enterobacteriaceae* (Magiorakos, 2012), la maggior parte dei ceppi mostra dei fenotipi di multiresistenza anche complessi (Tabella 10).

Tutti i ceppi sono resistenti alla ciprofloxacina (CIP) e la maggior parte (19/22) sono resistenti alla gentamicina (GEN). 12 ceppi sono resistenti alla combinazione trimetoprim-sulfametoxazolo e 8 al cloramfenicolo. Tutti i ceppi condividevano la suscettibilità alla tigeciclina e alla colistina. E' stato inoltre osservato un deciso aumento di ceppi con resistenza alla fosfomicina (FOS) a partire da gennaio 2018; i ceppi resistenti raccolti nell'ultimo periodo di analisi sono 8/13 (61,5%).

Isolato	ß -lattamasi		MIC (mg/L)			Co-resistenze
	Carbapenemasi	Altri geni *bla*	IPM	MEM	ETP	
CP-Ec1	VIM-1	TEM-1, SHV-12, CTX-M-15	4	2	2	CIP, GEN, CHL, SXT
CP-Ec2	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15	32	16	16	CIP, GEN
CP-Ec3	VIM-1, KPC-2	-	>128	>128	>128	CIP, GEN, CHL, SXT
CP-Ec4	VIM-1	TEM-1, SHV-12, CTX-M-15	4	2	2	CIP, GEN, CHL, SXT
CP-Ec5	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15	32	16	8	CIP, GEN
CP-Ec6	KPC-3	TEM-1, CMY-2	16	16	64	CIP, GEN, CHL, SXT
CP-Ec7	KPC-3	TEM-1	16	16	8	CIP, GEN, SXT
CP-Ec8	KPC-3	TEM-1	16	8	8	CIP, GEN, SXT
CP-Ec9	KPC-3	TEM-1	16	8	16	CIP, GEN, SXT
CP-Ec10	KPC-2	TEM-1	16	32	16	CIP, GEN, CHL, SXT, FOS
CP-Ec11	OXA-181	CMY-42	1	1	2	CIP, GEN, CHL, FOS
CP-Ec12	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15	8	4	16	CIP, GEN, SXT
CP-Ec13	KPC-3	-	64	32	16	CIP, GEN
CP-Ec14	KPC-2	TEM-1	16	64	16	CIP
CP-Ec15	KPC-3	TEM-1	16	16	16	CIP, CHL
CP-Ec16	KPC-3	TEM-1	16	8	8	CIP, GEN, SXT
CP-Ec17	OXA-181	CMY-42	2	2	8	CIP, GEN, FOS
CP-Ec18	KPC-3	TEM-1	32	32	16	CIP, FOS
CP-Ec19	KPC-3	TEM-1	>16	>16	>16	CIP, GEN, FOS
CP-Ec20	NDM-5	TEM-1	>16	>16	>16	CIP, GEN, SXT, FOS
CP-Ec21	KPC-3	TEM-1	>16	>16	>16	CIP, GEN, CHL, SXT, FOS
CP-Ec22	KPC-3	TEM-1	>16	>16	>16	CIP, GEN, FOS

Tabella 10 - *risultati ottenuti da procedure di antibiogramma per varie molecole antibiotiche, MIC per carbapenemi e test di PCR per geni di carbapenemasi e altre beta lattamasi eseguiti sui 22 campioni in esame.*

4.1 - Distribuzione delle carbapenemasi ed analisi del resistoma

Il primo risultato da evidenziare è l'ampia variabilità nella produzione di carbapenemasi. La carbapenemasi di tipo KPC è risultata la più diffusa (18 ceppi), con una netta prevalenza della variante KPC-3 (15 ceppi) rispetto alla KPC-2 che era presente in 3 isolati. La maggior presenza di KPC riflette la situazione di endemicità italiana essendo tale gene largamente diffuso in ambito ospedaliero, soprattutto nell'altra importante specie nosocomiale *K. pneumoniae* (Giani, 2017). Tra i ceppi KPC-produttori, va sottolineata la situazione di un paziente particolare, ricoverato in momenti diversi (da gennaio 2017 ad aprile 2018), dal quale sono stati ottenuti 4 ceppi di *E. coli* (CP-Ec7, CP-Ec8, CP-Ec9, CP-Ec16) da tre differenti distretti (emocoltura, aspirato tracheale, aspirato bronchiale). Le indagini successive hanno dimostrato che i 4 ceppi erano identici sia fenotipicamente che genotipicamente. Questa particolare situazione indicava una colonizzazione persistente del ceppo in questione.

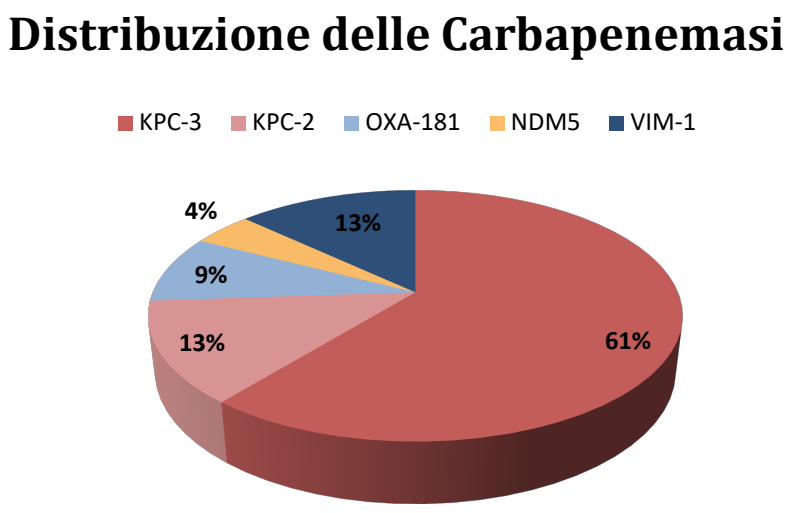

Figura 9 *- diagramma a torta raffigurante la distribuzione dei geni di carbapenemasi nei ceppi in esame. Eclatante la predominanza di KPC, positiva nel 74% dei campioni, di cui 18% tipo KPC-2 e 82% tipo KPC-3. OXA-181 positivo nel 9% dei campioni, NDM-5 nel 4%, VIM-1 nel 13%.*

Una situazione simile si è verificato per i due isolati positivi per VIM-1. I due ceppi (CP-Ec1,CP-Ec4) erano stati ottenuti dallo stesso paziente da campioni clinici differenti eseguiti a distanza di 4 mesi, il primo da cute, il secondo da tampone uretrale; i due isolati sono risultati geneticamente identici alle indagini successive di tipizzazione.

L'enzima VIM-1 è stato identificato anche in un terzo ceppo (CP-Ec3) in associazione con KPC-2; il ceppo era stato isolato da un tampone rettale del paziente più anziano. L'isolato CP-Ec3 positivo per le due carbapenemasi KPC-2 e VIM-1 ha le MIC più alte (>128 mg/L); tutti gli altri ceppi che producono KPC-3 o KPC-2 hanno valori di MIC comparabili (range 8-32) per tutti i carbapenemi.

Un discorso a parte va fatto per i ceppi che possiedono VIM-1 oppure OXA-181 come unica carbapenemasi identificata.

Per quanto riguarda i due ceppi con VIM-1, essi dimostrano una ridotta sensibilità piuttosto che una vera resistenza, perlomeno alle molecole di imipenem e meropenem. Questo aspetto è già stato riportato in letteratura fin dalla prima descrizione di questa metallo-carbapenemasi in *P. aeruginosa* (Lauretti L, 1999). Difatti in questa specie VIM è espressa ad alto livello mentre in *E. coli* ha un basso livello di espressione. Questo risultato è stato ampiamente osservato in altri isolati clinici di *E. coli* (Accogli, 2014).

I due ceppi, CP-Ec11 e CP-Ec17, che producevano la variante OXA-181, erano stati ottenuti da tamponi rettali di due pazienti ricoverati in reparti diversi. I test di sensibilità dimostrano che entrambi i ceppi sono sensibili ad imipenem e meropenem e resistenti ad ertapenem, sebbene i valori di MIC ottenuti siano lievemente più alti rispetto ai due ceppi con VIM-1.

Di rilievo il riscontro di un isolato (CP-Ec20) positivo per l'enzima NDM-5; il ceppo era stato ottenuto a novembre 2018 da un tampone vaginale. Sia la fonte d'isolamento che la dimostrazione di questo enzima meritano un approfondimento poiché la carbapenemasi NDM, diffusa in diverse regioni del Sud-Est asiatico (Yong D, 2009) è scarsamente diffusa nel territorio italiano.

4.2 - Associazione con gli altri geni di beta lattamasi

Isolato	ß -lattamasi	
	Carbapenemasi	Altri geni *bla*
CP-Ec1	VIM-1	TEM-1, SHV-12, CTX-M-15
CP-Ec2	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15
CP-Ec3	VIM-1, KPC-2	-
CP-Ec4	VIM-1	TEM-1, SHV-12, CTX-M-15
CP-Ec5	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15
CP-Ec6	KPC-3	TEM-1, CMY-2
CP-Ec7	KPC-3	TEM-1
CP-Ec8	KPC-3	TEM-1
CP-Ec9	KPC-3	TEM-1
CP-Ec10	KPC-2	TEM-1
CP-Ec11	OXA-181	CMY-42
CP-Ec12	KPC-3	TEM-1, CTX-M-15
CP-Ec13	KPC-3	-
CP-Ec14	KPC-2	TEM-1
CP-Ec15	KPC-3	TEM-1
CP-Ec16	KPC-3	TEM-1
CP-Ec17	OXA-181	CMY-42
CP-Ec18	KPC-3	TEM-1
CP-Ec19	KPC-3	TEM-1
CP-Ec20	NDM-5	TEM-1
CP-Ec21	KPC-3	TEM-1
CP-Ec22	KPC-3	TEM-1

Tabella 11 *– Confronto dei risultati di analisi della carbapenemasi prodotta (sinistra) e eventuale associazione con altri geni di beta-lattamasi (destra).*

Con l'eccezione di due ceppi (CP-Ec3 e CP-Ec13) per tutti gli altri è stato possibile evidenziare l'associazione tra carbapenemasi e un altro gene di ß-lattamasi. In particolare l'enzima TEM-1 risulta essere la ß-lattamasi di classe A più diffusa (18 positività su 22 ceppi in esame, 81.8%); 2 ceppi KPC-3 positivi (CP-Ec5 e CP-Ec12) presentavano in associazione la sola ESBL CTX-M-15. I due ceppi identici VIM-1 produttori (CP-Ec1 e CP-Ec4) erano gli unici a presentare associazione con TEM-1 e con le due ESBL CTX-M-15 e SHV-12.

Entrambi i ceppi positivi per OXA-181 hanno il gene *bla*CMY-42, codificante per una ß-lattamasi di classe C attiva sulle cefalosporine, in un quadro generale che correla con la ridotta sensibilità ai carbapenemi IMP e MEM di questi due ceppi.

CMY-42 è una variante derivata dall'enzima CMY-2 (Hentschke M et al., 2011) che è stato identificato in 1 solo isolato (CP-Ec6) positivo per KPC-3 e TEM-1.

4.3 - Risultati dell'analisi di tipizzazione

Genotypic Analyses			
Isolato	**MLST**	**ERIC**	**PFGE**
CP-Ec1	ST 131	1	A
CP-Ec2	ST 131	1	B
CP-Ec3	ST 1266	2	C
CP-Ec4	ST 131	1	A
CP-Ec5	ST 131	1	A1
CP-Ec6	ST 1011	3	D
CP-Ec7	ST 131	1	A2
CP-Ec8	ST 131	1	A2
CP-Ec9	ST 131	1	A2
CP-Ec10	ST 69	4	E
CP-Ec11	ST 38	5	F
CP-Ec12	ST 131	1	A3
CP-Ec13	ST 354	6	NT
CP-Ec14	ST 131	1	A4
CP-Ec15	ST 101	7	H
CP-Ec16	ST 131	1	A2
CP-Ec17	ST 38	5	F1
CP-Ec18	ST 405	8	I
CP-Ec19	ST 405	8	I
CP-Ec20	ST 405	8	J
CP-Ec21	ST 405	8	I
CP-Ec22	ST 405	8	I

Tabella 12 – *Confronto dei risultati tra tre diverse metodiche di tipizzazione; in ordine da sinistra verso destra: Multi-Locus Sequence Type (MLST), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus –PCR (ERIC), Pulseed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).*

Confrontando i risultati ottenuti con tre diverse procedure di tipizzazione, è stato possibile dimostrare una piena concordanza tra i ST ottenuti mediante la tecnica MLST ed i numeri di assegnazione dei profili ERIC. In entrambe le procedure infatti sono stati individuati 8 diversi profili/STs. In particolare, n. 10 isolati di *E. coli* appartenevano al clone pandemico internazionale ST131 (Wirth et al, 2006), mentre n. 5 ceppi appartenevano a ST405. Due isolati erano ST38 mentre i restanti 5 ceppi appartenevano a ST diversi (ST1266, ST1011, ST69, ST354, ST101). Questi risultati confermano che la procedura ERIC-PCR può essere utile per analizzare la correlazione genetica a lungo termine dei ceppi di *E. coli*, così come riconosciuto universalmente per la procedura MLST. Viceversa, date le caratteristiche peculiari della genotipizzazione mediante XbaI-PFGE, una tecnica che evidenzia la distanza filogenetica a breve termine, è stato possibile dimostrare una varietà all'interno dei genomi con identico profilo ERIC/ST. In particolare, nell'ambito dei ceppi appartenenti al ST131 - e pertanto indistinguibili in base ai due sistemi di tipizzazione descritti sopra - sono stati individuati quattro pulsotipi correlati a quello principale A (A1-A4) ed un pulsotipo distinto (B). Allo stesso modo, anche per il secondo ST più frequente (ST405), 4 genomi mostravano identico pulsotipo (I) e solo 1 campione mostrava un pulsotipo diverso (J). Da sottolineare che i 4 ceppi di *E. coli* identici (ST405 - ERIC8 - pulsotipo I) erano stati ottenuti i primi due dallo stesso paziente ma in momenti e reparti differenti, gli altri due da pazienti e reparti diversi ed indicavano la circolazione di un nuovo clone negli ultimi mesi del 2018.

5 – DISCUSSIONE

La sempre più grande diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi rappresenta attualmente un problema di prioritaria importanza in sanità pubblica, che nel tempo sta rendendo necessari provvedimenti atti allo scopo di studiarne la prevalenza sia a livello ospedaliero che comunitario, valutarne le caratteristiche fenotipiche, genotipiche e di trasmissibilità al fine di limitare la diffusione e stabilire i migliori approcci terapeutici per le gravi patologie causate da questi batteri.

Sempre più spesso correlato a importanti e dalla alta mortalità infezioni nosocomiali, *E. coli* è attualmente tra le *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi il batterio Gram-negativo di maggior rilevanza clinica. Sebbene secondo per diffusione a *Klebsiella pneumoniae*, che presenta una diffusione pandemica nel territorio nazionale (Giani et al., 2017), *E. coli* è capace di diffondere nella popolazione molto più rapidamente e, grazie all'ambiente intestinale e alla localizzazione di geni di resistenza su elementi genetici mobili, può essere considerata una delle specie maggiormente responsabili degli scambi genetici di geni di carbapenemasi in ambito intestinale.

Dai risultati di questo studio di sorveglianza è emerso innanzitutto un aumento della prevalenza di *E. coli*; se infatti da agosto 2015, data di inizio della raccolta dei campioni, fino a dicembre 2017 sono stati ottenuti 9 ceppi, il 60% dei ceppi totali sono stati raccolti nel 2018. Questo dato poteva riflettere sia un aumento della circolazione di ceppi CPE nella popolazione, sia l'attuazione di procedure di sorveglianza a livello sanitario per la prevenzione e il controllo dei patogeni ospedalieri. Difatti, se fino a dicembre 2017 gli isolati provenienti da tampone rettala consistevano nel 22% (2 su 9 totali raccolti), nel 2018 i tamponi rettali costituivano il 77% (10 su 13).

Altro aspetto peculiare emerso dallo studio è la diversità genetica di questi 12 ceppi di E. coli ottenuti da tampone rettale: sono stati identificati 8 differenti profili di MLST. Al contrario, tutti gli isolati ottenuti dai diversi campioni clinici appartenevano tutti al medesimo sequence type, vale a dire ST131, un ben noto e ampiamente diffuso clone internazionale multiresistente e causa di infezioni extraintestinali (Mathers et

al.,2015). Sebbene dalla letteratura questo clone era già ampiamente diffuso a livello mondiale e solitamente associato con la produzione della ESBL CTX-M-15, considerato un marker importante di questo clone (Mathers et al.,2015), solo 5 *E. coli* sui 10 totali ST131 analizzati erano positivi per CTX-M-15. Di questi 5 isolati ST131 e negativi per CTX-M-15, 4, geneticamente identici e con identico profilo di resistenza, provenivano dallo stesso paziente ed erano stati raccolti in un arco di tempo pari ad un anno e mezzo (quadro che evidenziava una colonizzazione persistente); il ceppo restante rappresentava un'eccezione alla regola, essendo l'unico *E. coli* ST 131 ottenuto da tampone rettale.

Di particolare interesse è la dimostrazione di un ceppo di *E. coli* produttore di NDM-5 che era stato isolato da un tampone vaginale verso la fine del 2018. Il ceppo in questione apparteneva al ST405, così come altri 4 ceppi identici isolati da settembre a dicembre 2018; esso tuttavia era positivo per CTX-M-15 ed aveva un profilo di PFGE differente.

Per quanto riguarda la distribuzione delle carbapenemasi prodotte, la predominanza osservata di KPC in entrambe le varianti alleliche (KPC-3 e KPC-2), sembrava riflettere la maggiore prevalenza di isolati di *K. pneumoniae* KPC-produttori nel nostro ospedale. La presenza endemica di *K. pneumoniae* appartenente al clone internazionale CC258 osservata a livello nazionale (Giani et al., 2017) è stata infatti evidenziata anche per l'azienda ospedaliera Torrette di Ancona in un recente lavoro (Brescini et al., 2019).

Due isolati identici (CP-Ec1 e CP-Ec4) ottenuti dal paziente più giovane a distanza di 4 mesi, erano produttori di VIM-1 e positivi anche per l'enzima TEM-1 e per le due ESBL SHV-12 e CTX-M-15; tali ceppi mostravano un profilo genetico identico a quello di isolati identificati di recente in Italia (Accogli M et al.,2014). Nonostante l'associazione osservata di VIM-1 con altre tre ß-lattamasi, i due ceppi presentavano una ridotta suscettibilità ai tre carbapenemi, caratteristica già riportata in letteratura (Accogli et al., 2014; Aschbacher et al., 2013). Al contrario, l'isolato che dimostrava le due carbapenemasi VIM-1 e KPC-2 (ST1266) aveva le MIC più elevate (> 128 mg/L) per le

tre molecole testate. Anche se piuttosto rari, ceppi di *E. coli* che producono due carbapenemasi, come il ceppo isolato a Torrette da tampone rettale, dimostrano sempre una resistenza ad alto livello; uno di questi ceppi, produttore di VIM-1 e della variante KPC-3, apparteneva ad un diverso sequence type (ST448) ed era stato isolato in Spagna, responsabile di una sepsi urinaria (Porres-Osante et al., 2014).

Da segnalare infine la dimostrazione di due ceppi con OXA-181 e dell'isolato già descritto sopra produttore di NDM-5. L'unica carbapenemasi a non essere stata rilevata è IMP, dato che senza dubbio riflette la scarsa diffusione di ceppi positivi al di fuori della regione asiatica (Nordmann et al., 2014).

Complessivamente, i risultati sembrano confermare la capacità di *E. coli* di veicolare efficacemente geni di resistenza antibiotica nella popolazione, contribuendo alla diffusione di geni di carbapenemasi di raro riscontro in Italia, come OXA-181 (Grundmann et al., 2017). Nel nostro studio sono stati identificati due ceppi produttori di OXA-181, isolati da pazienti diversi, la cui tipizzazione ha evidenziato una stretta correlazione, ma non una perfetta identità: i due isolati appartenevano al ST38 ma avevano profili di PFGE strettamente correlati e un diverso profilo di resistenza. Interessante è l'associazione dimostrata tra ST38 e OXA-181. Entrambi i nostri due ceppi non mostrano correlazione con il primo *E.coli* OXA-181 identificato di recente in Italia, appartenente al ST410 (Piazza et al., 2018) e possono essere pertanto considerati come i primi due ceppi di *E.coli* OXA-181 ST 38 isolati sia in Ancona che in Italia.

Il fatto che OXA-181 abbia una scarsa attività idrolitica nei confronti dei carbapenemi, con valori di MIC di resistenza molto bassi, e sia spesso identificabile solo con test più approfonditi, potrebbe essere la vera spiegazione alla bassa prevalenza osservata in Italia, celando in realtà una situazione di ampia diffusione nella comunità.

In base ai requisiti bibliografici per la definizione di *Enterobacteriaceae* multiresistenti (Magiorakos et al., 2012), tutti i ceppi in esame dimostravano complessi profili di multiresistenza. Dai saggi di sensibilità antibiotica, è emerso che tutti ceppi in esame erano resistenti all'ertapenem, sebbene con livelli ampiamente variabili di resistenza (range, 2->128) mentre nei confronti di imipenem e meropenem i valori di

MIC dimostravano anche livelli di suscettibilità o un basso livello di resistenza. Tutti i ceppi erano resistenti alla ciprofloxacina, l'86,4% (19 isolati su 22) erano resistenti alla gentamicina, mentre le resistenze agli antibiotici come trimetoprim-sulfametoxazolo (45,4%) e cloramfenicolo (31,8%) erano meno evidenti. Un risultato importante da segnalare è stata la comparsa nel 2018 della resistenza alla fosfomicina, mantenutasi poi per il restante periodo di analisi nel 61,5% dei campioni (8 su 13 campioni isolati nel 2018): si tratta di un antibiotico di regola utilizzato nel trattamento delle infezioni delle vie urinarie causate da *E. coli*, di norma sensibile a questa molecola, ma che trova sempre più indicazione anche nel trattamento di altri patogeni multi resistenti, per via della sua peculiare struttura molecolare, la quale differendo dalle altre classi antimicrobiche, raramente genera cross reattività. L'aumentato uso in questi anni per il trattamento di patogeni MDR tra cui molti nosocomiali, potrebbe aver favorito la selezione di un fenotipo resistente in *E.coli* nell'ambito di particolari cloni.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalle analisi di tipizzazione, sicuramente l'aspetto più importante ottenuto da questo studio è la concordanza tra i risultati della procedura MLST ed il profilo ERIC derivato da procedure di amplificazione ed elettroforesi. Per tutti i ceppi in esame, ciascun sequence type coincideva con uno specifico profilo ERIC; questo potrebbe facilitare future indagini di screening dei ST, dal momento che la procedura ERIC è meno impegnativa a livello di attrezzature, costi e tempi di esecuzione rispetto alla procedura MLST, almeno a livello della specie *E. coli*. La terza tecnica di tipizzazione utilizzata è stata la PFGE preceduta da digestione enzimatica con XbaI; questa tecnica ha una capacità discriminante superiore e ci ha consentito di evidenziare una variabilità genetica all'interno dei ceppi appartenenti al clone ST131, con 6 pulsotipi diversi. Grazie a questa tecnica è stato inoltre possibile distinguere, nell'ambito dei 5 ceppi appartenenti al clone ST405, l'unico ceppo produttore della metallo-carbapenemasi NDM-5, rispetto agli altri 4 ceppi che avevano un profilo identico. L'analisi dei profili di restrizione mediante PFGE è di grande importanza in studi come questo ed in generale per evidenziare i cambiamenti genetici a breve termine che si verificano nei ceppi CPE, come quelli dovuti a trasferimento genico

orizzontale di plasmidi e trasposoni, al fine di aumentare le conoscenze sulla loro diffusione.

BIBLIOGRAFIA

- **Accogli M, Giani T, Monaco M et al.** 2014. "Emergence of Escherichia coli ST131 sub-clone H30 producing VIM-1 and KPC-3 carbapenemases, Italy". J Antimicrob Chemother. 69(8), 2293-2296
- **Ambler RP**. 1980. "The structure of ß-lactamases. Philosophical Transaction of the Royal Society of London". Series B, Biological Sciences. Mag; 289 (1036): 321-331. DOI:10.1098/rstb.1980.0049.
- **Aschbacher R, Giani T, Corda D, Conte V, Arena F, Pasquetto V, Scalzo K, Nicoletti M, Rossolini GM, Pagani E.** 2013. "Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae during 2011-12 in the Bolzano area (Northern Italy): increasing diversity in a low-endemicity setting". Diagn Microbiol Infect Dis. 77(4):354-6.
- **Brescini L, Morroni G, Valeriani C, Castelletti S, Mingoia M, Simoni S, Masucci A, Montalti R, Vivarelli M, Giacometti A, Barchiesi F**. 2019. "Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing Klebsiella pneumoniae from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy". BMC Infect Dis. 12;19(1):611. doi: 10.1186/s12879-019-4268-9.
- **Bush K.** 2018. "Past and Present Perspectives on ß-Lactamases". Antimicrob Agents Chemother. Set; 62 (10). pii: e01076-18. DOI: 10.1128 / AAC.01076-18.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Wayne, PA.** 2015. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- **Dallenne C, Da Costa A, Decré D et al.** 2010. "Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important ß-lactamases in Enterobacteriaceae". J Antimicrob Chemother. Mar; 65 (3): 490-495. DOI: 10.1093 / jac / dkp498.

- **EUCAST**. 2019. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters". Version 9.0 www.eucast.org.
- **Giani T, Antonelli A, Caltagirone M et al**. 2017. "Evolving ßlactamase epidemiology in Enterobacteriaceae from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients". Euro Surveillance. Ago; 22 (31). pii: 30583. DOI: 10.2807 / 1560-7917.ES.2017.22.31.30583.
- **Grundmann H, Glasner C, Albiger B et al**. 2017. "Occurrence of carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study". Lancet Infect Dis; 17: 153-163.
- **Hentschke M, Kotsakis SD, Wolters M, Heisig P, Miriagou V, Aepfelbacher M**. 2011. "CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase". Microb. Drug Resist. 17(2), 165-169.
- **Hunter S, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrighley D, Barrett T, Ribot E**, 2005. "Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard". Journal of Clinical Microbiology, 43:1045–1050, No. 3.
- **Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M**. 1995. "Plasmid-mediated dissemination of the metallo-b-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of Serratia marcescens". Antimicrob Agents Chemother; 39: 824–829.
- **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al.** 1999. "Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo-ßLactamase Gene from a Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolate". Antimicrob Agents Chemother. Jul; 43 (7): 1584–1590.

- **Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH.** 2016. "Global Dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods". Frontiers in Microbiology. 7(895). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00895.
- **Livermore DM**. 1995. "β-lactamase in Laboratory and Clinical Resistance". Clinical Microbiology Reviews. 8(4):557-584.
- **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL.** 2012. "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance". Clinical Microbiology Infection; 18: 268–281. DOI: 10.1111/j.14690691.2011.03570.
- **Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD**. 2015. "The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae". Clin. Microbiol. Rev. 28(3), 565-91.
- **Nordmann P, Dortet L, Poirel L**. 2012. "Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!" Trends in Molecular Medicine; Vol. 18, No. 5.
- **Nordmann P, Poirel L**. 2014. "The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide". Clinical Microbiology and Infection. 20 (9): 821-830. DOI: 10.1111 / 14690691.12719.
- **O'Neill J**. 2014. "Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations". Review on Antimicrobial Resistance.
- **Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R et al.** 2003. "Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy". J Clin Microbiol. Set; 41 (9): 4264-4269. DOI: 10.1128 / jcm.41.9.4264-4269.2003.

- **Piazza A, Comandatore F, Romeri F, Pagani C, Floriano AM, Ridolfo A, Antona C, Brilli M, Mattioni Marchetti V, Bandi C, Gismondo MR, Rimoldi SG.** 2018. "First Report of an ST410 OXA-181 and CTX-M-15 Coproducing Escherichia coli Clone in Italy: A Whole-Genome Sequence Characterization". Microb Drug Resist. 24(8):1207-1209. doi: 10.1089/mdr.2017.0366.
- **Poirel L, Naas T, Nicolas D et al**. 2000. "Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-b-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonasaeruginosaclinical isolate in France". Antimicrob Agents Chemother; 44: 891–897.
- **Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P**. 2004. "Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae". Antimicrobial agents and chemotherapy. 48(1): 15-22.
- **Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P**. 2011. "Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes". Diagnostic Microbiologiy and Infectious Disease. 70 (1): 119-123. DOI: 10.1016 / j.diagmicrobio.2010.12.002.
- **Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y**. 2014. "Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing Escherichia coli strain in Spain". J. Antimicrob. Chemother. 69(7), 1792-1795.
- **Sader HS, Mendes RE, Pfaller MA et al**. 2017. "Antimicrobial activities of aztreonam-avibactam and comparator agents against contemporary (2016) clinical Enterobacteriaceae isolates". Antimicrob Agents Chemother. Dic; 62 (1). pii: e01856-17. DOI: 10.1128 / AAC.01856-17.
- **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing". Journal of clinical microbiology. 33(9):2233-2239.

- **Versalovic J,Koeuth T,Lupski JR**. 1991. ”Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes”. Nucleic Acids Res. Dec 25;19(24):6823-31. DOI:10.1093/nar/19.24.6823.
- **Wirth T, Falush D, Lan R et al.** 2006. “Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective”. Mol. Microbiol. 60(5), 1136-1151.
- **World Health Organization (WHO).** 2017. “Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics”.
- **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al.** 2011. “Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae”. Antimicrob Agents Chemother; 45: 1151– 1161.
- **Yong D, Toleman MA, Giske CG et al.** 2009. “Characterization of a new metallo-ß-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India”. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53 (12): 5046–5054. DOI: 10.1128 / AAC.00774-09.