



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Caratterizzazione genotipica dei ceppi di Klebsiella pneumoniae produttori di NDM negli "Ospedali Riuniti delle Marche"

Genotypic characterization of NDM-producing Klebsiella pneumoniae strains in "Ospedali Riuniti delle Marche"

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giulia Cotononi

Relatore:

Dott. Gianluca Morroni

Correlatore:

Dott.ssa Gloria D'Achille

Sessione Autunnale (Ottobre)

Anno accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
1.1.1 Fattori di virulenza e biofilm	4
1.2 β -lattamici	7
1.2.1 Carbapenemi	8
1.3 Resistenza ai carbapenemi	11
1.3.1 Classificazione delle β -lattamasi	14
1.3.2 Carbapenemasi classe A	16
1.3.4 Carbapenemasi classe B.....	19
1.5 <i>K. pneumoniae</i> -NDM in Italia	26
1.5.1 Opzioni terapeutiche	29
1.5.2 Colistina	30
2. MATERIALI E METODI.....	36
2.1 Ceppi batterici	36
2.2 Saggi di amplificazione.....	36
2.3 Antibiotici	37
2.4 Test di sensibilità	38

2.5 Estrazione del DNA totale	39
2.5.1 <i>Qubit 4</i>	41
2.5.2 Elettroforesi.....	42
2.6 Tipizzazione	43
2.6.1 <i>PFGE</i>	43
2.6.2 <i>MLST</i>	47
2.7. Sequenziamento	48
2.7.1 Long reads sequencing.....	48
2.7.2 Short reads sequencing	53
2.8 Analisi di sequenza	60
3. RISULTATI	61
3.1 Saggi di amplificazione.....	61
3.2 Determinazione delle MICs	61
3.3 Tipizzazione	63
3.4.1 <i>MLST</i>	66
3.4.2 <i>ResFinder</i>	66
3.4.3 <i>PlasmidFinder</i>	70
3.4.4 Ricostruzione dei trasposoni codificanti <i>bla_{NDM}</i>	72

3.4.5 <i>CSIPhylogeny</i>	75
4. DISCUSSIONE.....	89
5. BIBLIOGRAFIA.....	101

1. INTRODUZIONE

La scoperta degli antibiotici a metà del XX secolo ha rivoluzionato il trattamento di numerose malattie infettive che individuano come agenti patogeni i batteri. Il loro impiego come misura profilattica nei protocolli pre-chirurgici è uno strumento fondamentale per prevenire lo sviluppo di infezioni, soprattutto nei soggetti immunodepressi, mentre il loro uso nel contrasto delle infezioni batteriche è una pratica consolidata e indispensabile nella medicina moderna. D'altro canto, il continuo ed eccessivo utilizzo di questi farmaci in campo medico e non, rappresenta una delle cause dell'insorgenza del fenomeno noto come antibiotico resistenza che ad oggi costituisce una delle più grandi problematiche di sanità pubblica a livello mondiale. Infatti, si stima che ogni anno in Europa, oltre 33.000 decessi siano attribuiti alle infezioni da batteri resistenti agli antimicrobici contratte in ospedale (HA) e in comunità (CA), con un ammontare di 1,5 miliardi di dollari in costi diretti e indiretti (*De Oliveira et al., 2020*). In aggiunta, l'affermarsi di microrganismi multidrug resistant (MDR) limita in misura ancora maggiore le terapie disponibili. Il termine MDR è stato coniato da ECDC¹ e CDC² in accordo con i break-points di EUCAST³,

¹ European Centre for Disease Prevention and Control

² Centers for Disease Control and Prevention

³ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CLSI⁴ e FDA⁵ per indicare ceppi batterici caratterizzati da insensibilità acquisita verso tre o più classi di antibiotici (*Magiorakos et al., 2011*).

Nel 2017, l’OMS⁶ ha pubblicato l’elenco di patogeni per i quali lo sviluppo e la commercializzazione di nuove terapie antimicrobiche è prioritaria. Tra questi, le specie batteriche caratterizzate da un maggior grado di criticità sono quelle raggruppate sotto l’acronimo ESKAPE⁷ (*World Health Organization, 2017*). All’interno di questo vasto gruppo di batteri MDR, *Klebsiella pneumoniae*, appartenente all’ordine delle Enterobacteriaceae, ricopre una posizione di rilievo rendendosi responsabile di numerose infezioni sia in ambito ospedaliero che comunitario. Una delle caratteristiche più preoccupanti di questi batteri è rappresentata dalla resistenza ai carbapenemi che comporta una maggiore difficoltà nella scelta di opzioni terapeutiche, in quanto i carbapenemi sono considerati antibiotici last resort per il trattamento di infezioni sostenute da batteri Gram-negativi MDR.

Per cercare di contenere la dispersione di isolati MDR e di ridurre le criticità ad essi associate, sono in corso degli studi focalizzati sulla ricerca e sullo sviluppo di possibili strategie d’intervento basate sul controllo delle infezioni,

⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute

⁵ Food and Drug Administration

⁶ Organizzazione Mondiale della Sanità

⁷ *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.

sull'applicazione di programmi di stewardship antimicrobica e sull'utilizzo di alternative terapeutiche ai carbapenemi (Noster et al., 2021).

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae è una specie batterica appartenente al genere *Klebsiella*, facente parte della famiglia delle Enterobacteriaceae. È un batterio Gram negativo dalla forma bastoncellare, asporigeno, immobile e anaerobio facoltativo (Figura 1). Descritto inizialmente nel 1882 come 'bacillo di Friedlaender' in merito all'identificazione da parte dell'omonimo batteriologo tedesco, il genere prende il nome di *Klebsiella* nel 1886 in onore dello scienziato Edwin Klebs.



Figura 1. Immagine al microscopio elettronico di *K. pneumoniae*
Fonte: <https://nursesed.net/klebsiella-pneumoniae-and-healthcare-acquired-infections/>

K. pneumoniae è un batterio generalmente trovato come commensale della mucosa gastrointestinale e respiratoria umana. In condizioni di immunocompromissione o immunodepressione riscontrabili in pazienti ospedalizzati, *K. pneumoniae* acquisisce rilevanza clinica comportandosi da patogeno opportunisto e rendendosi responsabile di infezioni del tratto urinario (UTIs), del tratto respiratorio e di sepsi, nei casi in cui l'infezione raggiunge il torrente circolatorio. Un ulteriore rischio tra i pazienti ospedalizzati è dato dalla presenza di device come cateteri vescicali o dispositivi per la ventilazione assistita, poiché tali strumentazioni rappresentano un'agevole via di ingresso per i batteri che riescono facilmente a colonizzarne i materiali formando biofilm e rendendo ulteriormente difficoltosa l'eradicazione. In ambiente comunitario invece, soggetti sani e di qualsiasi età possono essere affetti da gravi infezioni invasive a rapida progressione, come ascessi epatici ed endoftalmiti settiche associate a ceppi di *K. pneumoniae* ipervirulenti (hvKp). Questi isolati sono emersi per la prima volta a metà degli anni '80 nella regione Asia-Pacifico, dove sono attualmente prevalenti (Di Pilato et al., 2024).

1.1.1 Fattori di virulenza e biofilm

Le variazioni nello spettro clinico delle infezioni ad opera di *K. pneumoniae* possono essere in parte conferite alla presenza o all'espressione dei fattori di virulenza, oltre che al profilo di suscettibilità antimicrobica. *K. pneumoniae*

vanta infatti un corredo di vari fattori di virulenza, tra i quali possiamo citare la capsula polisaccaridica, il lipopolisaccaride (LPS), i pili e le fimbrie adesive e i siderofori. Gli isolati clinici di *K. pneumoniae* si distinguono generalmente per la produzione di una capsula polisaccaridica viscosa in grado di inibire o alterare il processo di fagocitosi della cellula ospite, aumentando di conseguenza la sopravvivenza del batterio. La sintesi di questa capsula dipende dalla presenza del cluster genico *cps*, una regione cromosomica di 15 kb che contiene tutte le informazioni necessarie al conferimento del sierotipo batterico. Fin ora sono stati identificati 77 diversi antigeni capsulari ceppo-specifici. Tra questi, il sierotipo K1 risulta maggiormente associato a infezioni piogeniche disseminate, mentre il K2 è uno dei sierotipi responsabili di UTIs (Clegg e Murphy, 2016). Il LPS è un componente fondamentale della parete dei batteri Gram negativi ed è costituito, dall'esterno verso l'interno, da antigene O, core oligosaccaridico e lipide A. Quest'ultimo svolge l'attività di endotossina, proteggendo il batterio dalle proteine sieriche del complemento dell'ospite e ostacolando l'azione del sistema immunitario umorale (Karampatakis et al., 2023). Sia i pili che le fimbrie, sono fattori implicati nell'adesione cellulare, in quanto favoriscono la colonizzazione del batterio in diversi distretti corporei, assumendo grande rilevanza nel tratto urinario. In *K. pneumoniae* sono stati caratterizzati tre tipi di fimbrie, tutti assemblati attraverso il pathway

chaperone/usher. Le fimbrie di tipo 1 sono codificate dal cluster genico *fim*, quelle di tipo 3 dal cluster *mrk* e le fimbrie Kpc da *kpcABCD* (Clegg e Murphy, 2016). Un'altra caratteristica che rende *K. pneumoniae* uno degli autori di infezioni persistenti, è la sua capacità di produrre biofilm, un aggregato di microorganismi che formano pellicole di matrice extracellulare in grado di aderire a vari tipi di superfici, sia biotiche che abiotiche. Questo risulta essere particolarmente problematico in ambito ospedaliero, dove il batterio riesce a colonizzare cateteri sia vescicali che venosi e dispositivi di ventilazione assistita. Le strutture principalmente coinvolte nella sintesi del biofilm sono i pili di tipo 3 e i polisaccaridi capsulari, responsabili dell'adesione e della composizione strutturale del biofilm (Wang et al., 2020).

Tra le strategie attuate per sopravvivere all'interno della cellula ospite, *K. pneumoniae* sfrutta i siderofori per sequestrare gli ioni ferro presenti nell'ospite e instaurare un'infezione stabile. Gli ioni ferro, infatti, sono implicati in molti processi essenziali per la sopravvivenza sia del batterio che dell'ospite, come ad esempio la replicazione del DNA, la trascrizione e le reazioni metaboliche. I principali trasportatori di ferro descritti in *K. pneumoniae* sono l'enterobactina, l'aerobactina, la yersinobactina, la salmochelina, individuati anche in altri Gram negativi e caratterizzati da diversa affinità di legame per gli ioni ferro (Karampatakis et al., 2023).

1.2 β -lattamici

La scelta della terapia antibiotica per il trattamento delle infezioni sostenute da *K. pneumoniae* ricade generalmente su quattro principali famiglie comprendenti gli aminoglicosidi, i chinoloni, le cefalosporine e i carbapenemi. Cefalosporine e carbapenemi fanno parte dell'ampia classe dei β -lattamici, che includono anche penicilline e monobattami. La scoperta di questo grande gruppo di antibiotici risale agli anni '20, quando Fleming caratterizzò per la prima volta la penicillina G cresciuta su piastre di *Stafilococco* inquinate da una muffa, sui quali esercitò un'azione antiseptica. La peculiarità di questo gruppo di antibiotici consiste nella presenza di un anello β -lattamico costituente il nucleo centrale della struttura molecolare e responsabile dell'attività antibatterica (Figura 2). Il meccanismo d'azione battericida dei β -lattamici si basa sul blocco della reazione di transpeptidazione del peptidoglicano a seguito del legame covalente con le PBP⁸ coinvolte nelle fasi finali della sintesi della parete batterica. L'efficacia e l'ampio spettro d'azione nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi, hanno contribuito a rendere i β -lattamici la classe antibiotica più utilizzata nei casi di malattie infettive tanto che negli Stati Uniti, costituiscono il 65% di tutte le prescrizioni di antibiotici iniettabili (*Bush e Bradford, 2016*).

⁸ Penicillin binding protein

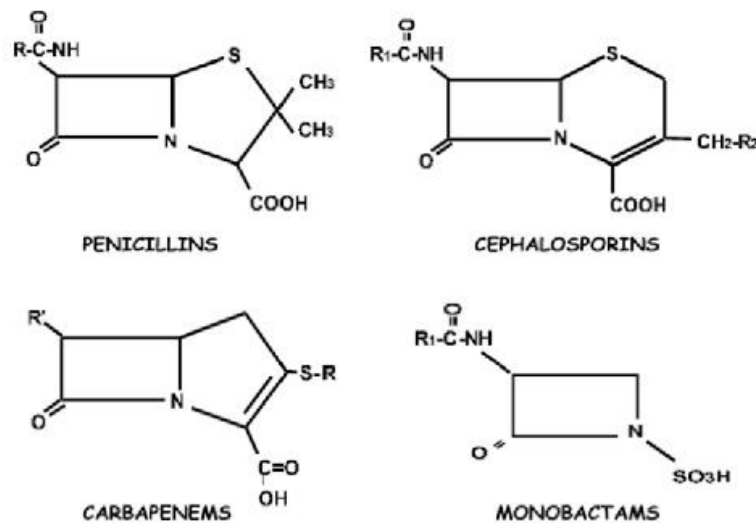


Figura 2. Struttura chimica dei principali β -lattamici

1.2.1 Carbapenemi

I carbapenemi sono una sottoclasse di antibiotici appartenente al gruppo dei β -lattamici. Sono antibiotici ad ampio spettro, attivi su una vasta gamma di batteri Gram negativi ma anche Gram positivi, aerobi e non e vengono descritti come farmaci di ultima istanza in quanto vengono utilizzati nei casi più gravi e in presenza di batteri MDR. Il target d'azione è a livello della parete cellulare batterica, dove agiscono come inibitori del dominio proteico di più PBP diverse mediante acilazione, determinando il blocco di varie reazioni peptidiche tra cui quella di reticolazione. Il risultato finale consiste nell'indebolimento del peptidoglicano, con conseguente lisi e morte cellulare a causa della variazione della pressione osmotica (*Papp-Wallace et al., 2011*).

La struttura dei carbapenemi ricalca quella delle penicilline, mostrando un anello insaturo a 5 membri fuso con un anello β -lattamico. Diversamente da esse però, hanno un doppio legame tra il C2 e il C3 ed un atomo di carbonio al posto dello zolfo al C1, che conferisce il più ampio spettro d'attività e la stabilità del farmaco alle β -lattamasi (Figura 3) (El-Gamal et al., 2017).

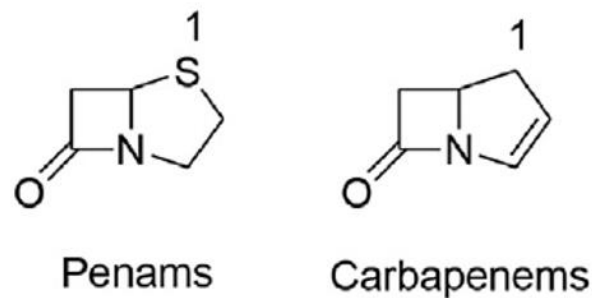


Figura 3. Struttura di penicillina e carbapenemi a confronto

La messa a punto dei carbapenemi deriva dalla necessità da parte degli scienziati di cercare molecole insensibili all'attività delle β -lattamasi, enzimi in grado di idrolizzare gli antibiotici β -lattamici già a fine anni '60. Il primo carbapenemico trovato in natura è l'acido olivanico, sintetizzato dal batterio *Streptomyces clavuligerus*, caratterizzato da ampio spettro d'azione. A causa della sua instabilità chimica e dei suoi bassi livelli di penetrazione nella cellula batterica gli studi a riguardo vengono presto abbandonati (Papp-Wallace et al., 2011). Successivamente da *Streptomyces cattleya*, viene isolata la tienamicina,

molecola che rappresenta il precursore di tutti i carbapenemi. La stereochimica della sua catena laterale idrossietilica rappresenta la peculiarità di questa classe antibiotica. Anche in questo caso il successo di questo composto risiede nell'elevata attività antimicrobica e nell'ampio spettro di azione nei confronti sia di batteri Gram-negativi quali *Pseudomonas aeruginosa*, batteri anaerobi, come *Bacteroides fragilis*, ma anche batteri Gram-positivi, come *Staphylococcus aureus* e streptococchi sensibili alla meticillina o all'oxacillina. Negli anni successivi, sono stati sviluppati nuovi analoghi della tienamicina che ad oggi costituiscono i carbapenemi più utilizzati in ambito clinico-sanitario. Tra questi ritroviamo l'imipenem, il meropenem e l'ertapenem (Figura 4) (Papp-Wallace et al., 2011).

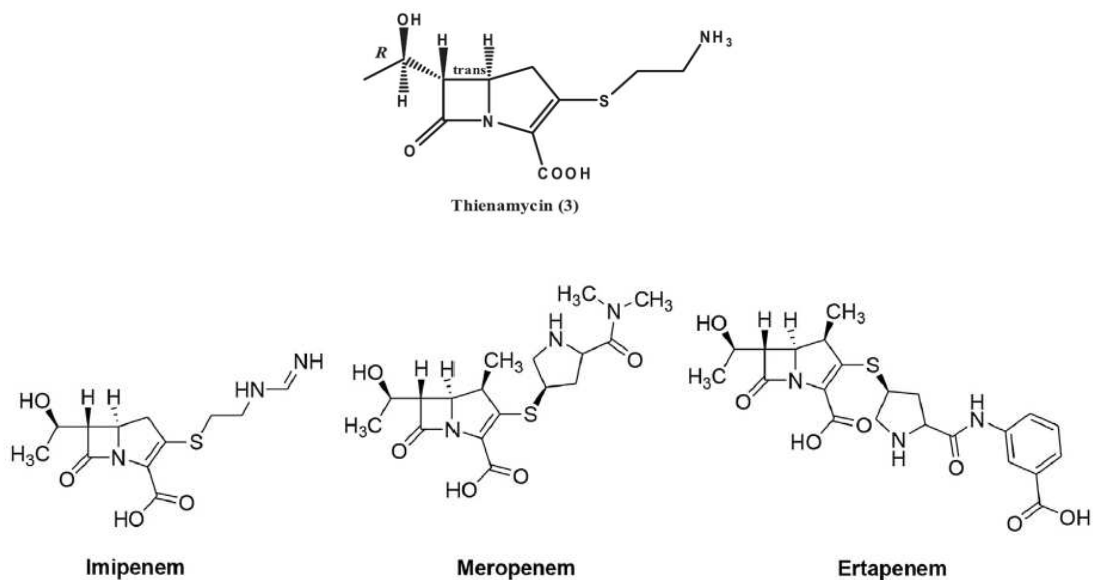


Figura 4. Struttura chimica di tienamicina, imipenem, meropenem ed ertapenem.

1.3 Resistenza ai carbapenemi

La resistenza ai carbapenemi in isolati clinici rappresenta un problema sanitario di enorme rilievo. A partire dall'isolamento del primo ceppo resistente ai carbapenemi negli Stati Uniti nel 1997 (Clegg e Murphy, 2016), l'incidenza di questi batteri è aumentata considerevolmente fino a raggiungere una diffusione globale. All'interno della famiglia delle Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* si distingue come la specie patogena di maggiore rilevanza clinica per la sua propensione ad acquisire determinanti di resistenza a varie classi di antibiotici tra cui i carbapenemi. In Europa i dati raccolti tra il 2018 e il 2022 dalla rete di sorveglianza EARS-Net⁹, hanno evidenziato un aumento significativo dell'incidenza di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CR-KP) per la popolazione dell'UE¹⁰/EEA¹¹. Le percentuali di resistenza per questa classe di antibiotici hanno mostrato situazioni diversificate tra i Paesi sottoposti all'indagine, rivelando valori più elevati nell'Europa meridionale e orientale rispetto all'Europa settentrionale (Figura 5) (EARS- Net 2022).

⁹ European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

¹⁰ European Union

¹¹ European Economic Area

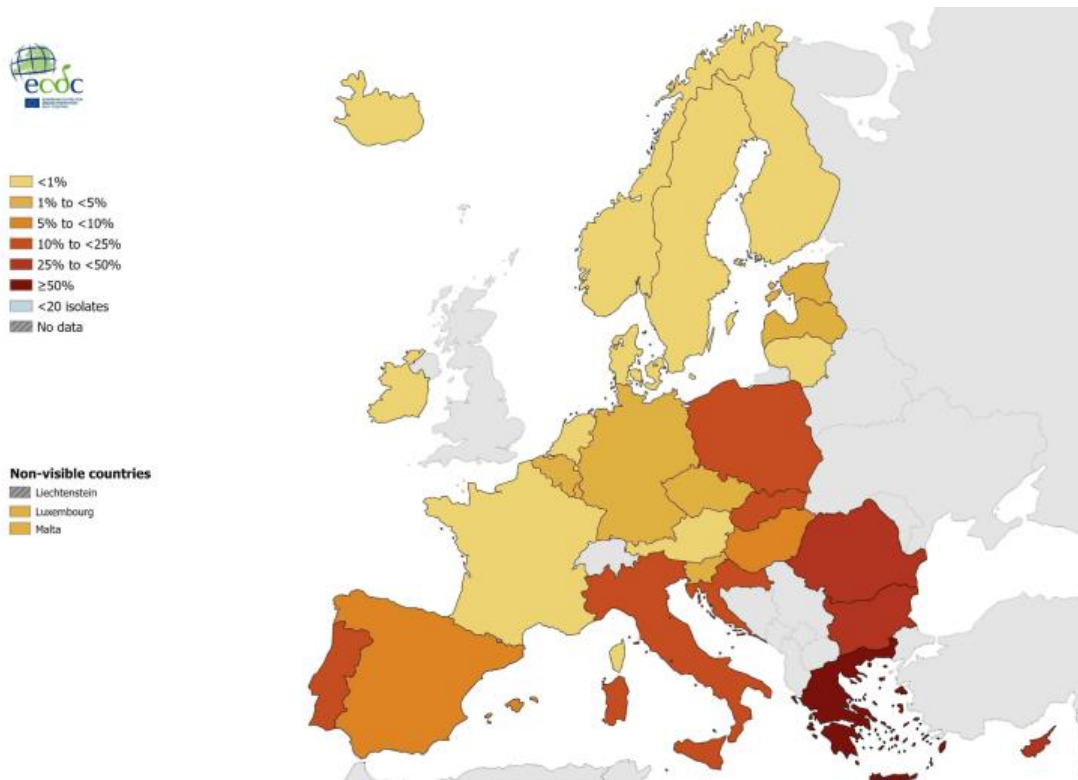


Figura 5. Distribuzione degli isolati invasivi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi in UE/EEA nel 2022. Le percentuali di resistenza antimicrobica verso i carbapenemi sottoposti all'indagine sono più elevate nell'Europa meridionale e orientale rispetto all'Europa settentrionale (caratterizzate da colore più scuro).

Fonte: EARS-net 2022

La resistenza ai carbapenemi può dipendere da molteplici meccanismi batterici, come modificazioni nella permeabilità della membrana esterna a seguito dalla perdita di porine, alterazioni dell'espressione genica a livello di sistemi di efflusso e la degradazione enzimatica dell'antibiotico (Ma et al., 2023). Infatti, i carbapenemi riescono ad entrare nelle cellule batteriche tramite diffusione attraverso la membrana cellulare esterna. Su di essa sono localizzate proteine appartenenti alla famiglia di porine *Omp*, che regolano l'ingresso di molecole

esterne. Mutazioni a livello di queste porine possono impedire l'ingresso dei carbapenemi nelle cellule batteriche risultando in fenotipi di resistenza (Tsai et al., 2011). Anche le pompe di efflusso svolgono un importante ruolo nello sviluppo della resistenza ai carbapenemi. Effettivamente, una over espressione dei geni codificanti le pompe di efflusso può portare all'eliminazione dei carbapenemi dallo spazio periplasmatico prima che essi possano svolgere la loro funzione. Ad ogni modo il principale meccanismo di resistenza ai carbapenemi risiede nella produzione di enzimi noti come carbapenemasi.

Statisticamente a livello Europeo, la maggior parte delle CR-KP risulta insensibile ai carbapenemi per via della produzione di carbapenemasi, come dimostrato da uno studio condotto su più di 1700 *K. pneumoniae* isolate dai pazienti provenienti da 244 ospedali di 32 Paesi partecipanti all'indagine europea EuSCAPE¹² (David et al., 2019). Questi determinanti di resistenza agli antibiotici oltre che ad essere tramandati alla progenie tramite trasferimento verticale, possono essere trasmessi anche a diversi membri della famiglia delle Enterobacteriaceae, favorendo la rapida propagazione di fenotipi resistenti anche tra specie diverse. È stato osservato infatti come geni responsabili della resistenza ai carbapenemi in *K. pneumoniae* siano spesso associati a elementi genetici mobili come plasmidi e trasposoni, i quali possono essere facilmente

¹² European Survey on Carbapenamase-Producing Enterobacteriaceae

acquisiti da altre specie batteriche (*Pitout et al., 2015*). A favore di questa tesi è stato proposto il modello di trasferimento genico orizzontale del plasmide che porta geni di resistenza tra *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*, che condividono l'habitat del tratto gastrointestinale. In particolare questo 'passaggio' gioca un ruolo critico nei pazienti ospedalizzati, dove *K. pneumoniae* presenta un'alta incidenza di colonizzazione del distretto. Di conseguenza l'acquisizione del fenotipo di resistenza nella flora normale favorisce il suo trasferimento a ceppi responsabili di infezioni extraintestinali (*Clegg e Murphy, 2016*).

1.3.1 Classificazione delle β -lattamasi

Le β -lattamasi sono enzimi dalle origini molto antiche in quanto la loro produzione risale all'era pre-antibiotica, quando all'interno delle nicchie ecologiche alcuni microrganismi sintetizzavano questi enzimi per difendersi dall'azione dei β -lattamici presenti in natura (*Bush, 2018*). Essendo una famiglia enzimatica molto ampia, è stata suddivisa sulla base di diversi criteri per renderne più semplice la classificazione. In particolare, nel 1980 Ambler ha

definito quattro classi distinte di β -lattamasi in base all'omologia di sequenza amminoacidica: la classe A, B, C e D (Figura 6).

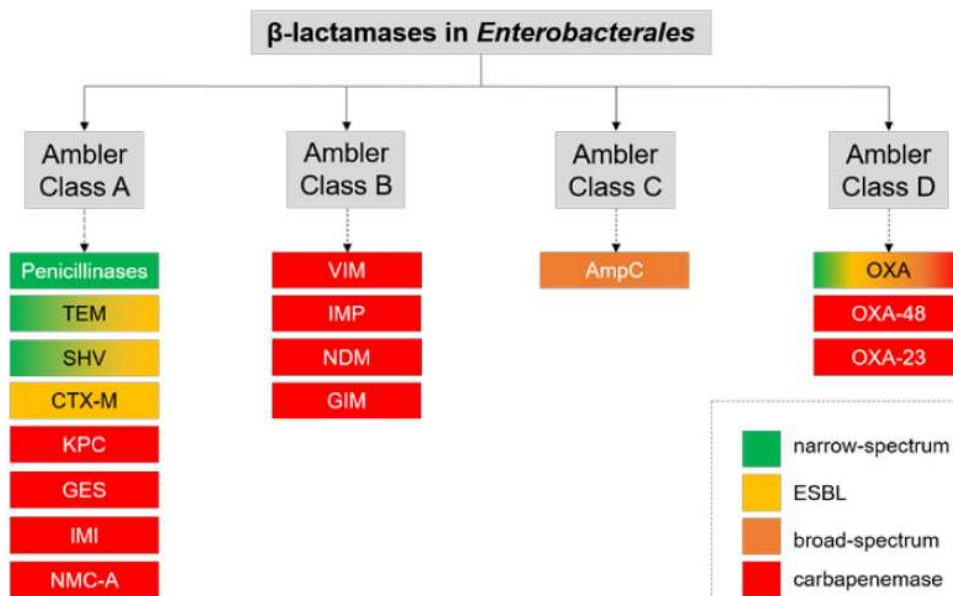


Figura 6. Classificazione di Amber per le principali β -lattamasi delle Enterobacteriaceae.
 Fonte: Noster et al., Antibiotics, 2021

Le carbapenemasi sono gli enzimi più versatili della famiglia delle β -lattamasi essendo caratterizzati da un ampio spettro d'azione che, oltre a penicilline, cefalosporine e monobattami, include anche i carbapenemi. Le carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae appartengono alle β -lattamasi di classe A, B e D (Kopotsa et al., 2019). Gli enzimi appartenenti alle classi A e D, note come serina-carbapenemasi, sono caratterizzati da una serina a livello del sito attivo e si avvalgono dell'idrolisi dell'estere della serina per la rottura dell'anello lattamico. Quelli appartenenti alla classe B, definiti metallo- β -lattamasi

(MBL), presentano invece uno o più ioni zinco nel sito attivo, che agevolano la catalisi del substrato. La localizzazione prevalentemente plasmidica dei geni codificanti per le principali carbapenemasi ha semplificato la loro trasmissione intra e inter-specie, contribuendo all'espansione di ceppi CP-KP su scala globale.

1.3.2 Carbapenemasi classe A

Le carbapenemasi di classe A sono enzimi caratterizzati dalla presenza di una serina nel sito attivo. Inizialmente erano considerati enzimi a localizzazione cromosomica, ma a partire dagli anni '90 sono emerse le prime carbapenemasi a localizzazione plasmidica da isolati clinici (*van Duin e Doi, 2017*). La loro azione può essere contrastata impiegando gli inibitori delle β -lattamasi, come l'acido clavulanico, il tazobactam, l'acido boronico e l'avibactam, che mostrano però un'efficacia variabile (*Pitout et al., 2015*). Le carbapenemasi più comuni di questo gruppo sono KPC¹³, GES¹⁴, NMC-A¹⁵ e SME¹⁶. Le carbapenemasi KPC, rilevate perlopiù in *K. pneumoniae*, sono ormai diffuse a livello globale. Negli ultimi dieci anni questi enzimi sono stati riscontrati anche in altre specie di Enterobacteriaceae e negli Stati Uniti, dove sono presenti con elevata incidenza, e sono spesso responsabili di focolai ospedalieri generati

¹³ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

¹⁴ Guiana Extended-Spectrum

¹⁵ not metalloenzyme carbapenemase

¹⁶ *Serratia marcescens* enzyme

dalla trasmissione di cloni resistenti tra i pazienti ricoverati (*Kopotsa et al., 2019*). Ad oggi sono note più di ottanta varianti di KPC. La prima ad essere scoperta è stata la KPC-1, isolata da un paziente ricoverato in Nord Carolina a fine degli anni '90. A seguito di questa segnalazione, sono poi emersi numerosi isolati di CP- KP derivanti dagli ospedali di New York (*Bradford et al., 2004*).

Dai risultati ottenuti a seguito dello studio CRACKLE 2¹⁷ condotto su 1040 campioni di CRE raccolti tra il 2016 e il 2017 negli Stati Uniti, è emerso che il 59% degli isolati era produttore di carbapenemasi. In particolare, KPC-2 e KPC-3 erano le varianti più frequentemente identificate e tutt'ora risultano essere, quelle maggiormente riscontrate (*Van Duin et al., 2020*). In Europa, i più elevati tassi di segnalazione di Enterobacteriaceae produttrici della carbapenemasi KPC si registrano nei Paesi mediterranei, tra i quali l'Italia e la Grecia si sono distinte per una condizione di endemicità a partire dal 2015 (*Albiger et al., 2015*). La diffusione globale delle Kp-KPC è generalmente associata a gruppi clonali (CG) detti "high-risk clones" tra cui il CG258 con i suoi due ST258 e 512 è il più rappresentato. Anche ST11 è caratterizzato da un'elevata rilevanza epidemiologica mondiale, così come l'ST101 comparso più recentemente (*Kopotsa et al., 2019*).

¹⁷ Consortium on Resistance Against Carbapenems in Klebsiella and other Enterobacteriaceae 2

1.3.3 Carbapenemasi classe D

Le carbapenemasi di classe D condividono con quelle di classe A la caratteristica di avere una serina nel sito attivo. Sono enzimi in grado di idrolizzare l'oxacillina e sono note più di 200 varianti caratterizzate da una debole attività carbapenemasi. Le carbapenemasi OXA-48 e OXA-181 che fanno parte della famiglia OXA-48 like, sono tra gli enzimi più diffusi di questa classe e si contraddistinguono per un'attività idrolitica più spiccata verso i carbapenemi. L'associazione con altri meccanismi di resistenza, come l'alterazione della permeabilità di membrana dovuta a mutazioni o delezioni di geni codificanti porine, contribuisce a determinare un profilo di resistenza elevato (Poirel *et al.*, 2012). Questi enzimi risultano inoltre insensibili agli inibitori delle β -lattamasi attualmente in commercio, come acido clavulanico, sulbactam, tazobactam e all'EDTA (Roodsari *et al.*, 2013). Il primo caso di OXA-48 è stato individuato nel 2001 in un ceppo clinico di *K. pneumoniae* MDR isolato da un paziente turco ricoverato a Parigi (Poirel *et al.*, 2004). Ad oggi questa carbapenemasi è diffusa tra tutti i membri delle Enterobacteriaceae, ma è riscontrata in particolar modo in *K. pneumoniae*. Nonostante le Enterobacteriaceae produttrici di OXA-48 siano diffuse a livello globale, negli Stati Uniti vengono isolate in maniera sporadica (Lyman *et al.*, 2015) mentre a livello Europeo si hanno numerose segnalazioni soprattutto nei Paesi

Mediterranei. In Turchia tra il 2014 e il 2015, la propagazione dei cloni di *K. pneumoniae* produttrici di OXA-48 ha raggiunto livelli tali da dichiarare lo stato di endemicità. Altri paesi come Spagna, Francia, Belgio e Romania presentavano, invece, una ‘diffusione inter regionale’ nello stesso periodo (Albiger *et al.*, 2015).

1.3.4 Carbapenemasi classe B

Le carbapenemasi di classe B, note anche come metallo β -lattamasi (MBL), si contraddistinguono per la presenza di uno o più ioni zinco a livello del sito attivo. Sono enzimi ad ampio spettro d’azione, in grado di idrolizzare tutti i β -lattamici eccetto i monobattami e sono inibiti da EDTA¹⁸ e DPA¹⁹ ma non dagli inibitori delle β -lattamasi come acido clavulanico, tazobactam o sulbactam (Potron *et al.*, 2015). Tra le principali MBLs riscontrate nelle CPE vi sono IMP²⁰, VIM²¹ e NDM²². La carbapenemasi IMP è stata tra le prime MBLs ad essere descritta nelle Enterobacteriaceae. Dalla prima segnalazione di IMP-1 in Giappone nel 1991 da un isolato di *Serratia marcescens*, sono state poi notificate oltre 40 varianti diffuse in tutto il mondo e ad oggi Cina, Giappone e Australia sono i paesi con una maggiore incidenza. Questa rapida diffusione

¹⁸ EthylenDiaminoTetracetyc Acid

¹⁹ Dipicolynic acid

²⁰ Imipenemase

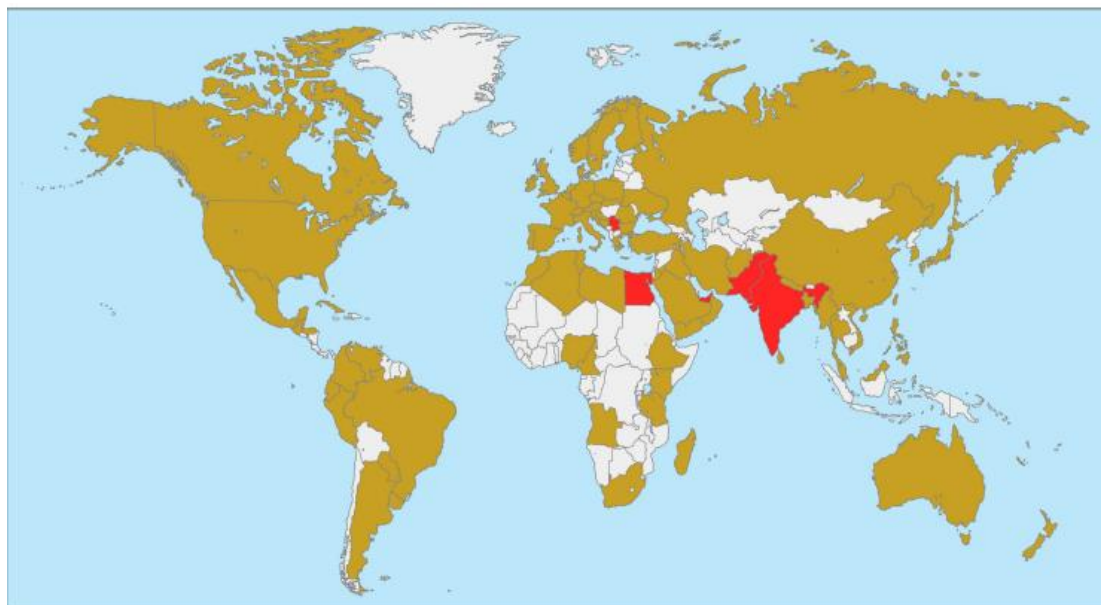
²¹ Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

²² New Delhi metallo-beta-lactamase

del gene bla_{IMP} è stata resa possibile dalla sua localizzazione a livello plasmidico (Matsumura et al., 2018). VIM è stata individuata per la prima volta nel 1997 a Verona da un isolato clinico di *P. aeruginosa*. Il gene bla_{VIM} era localizzato a livello di un integrone di classe 1 (Lauretti et al., 1999) (Poirel et al., 2000). Di questo gruppo sono note più di 40 varianti, di cui VIM-1 è la più rappresentata nelle Enterobacteriaceae e VIM-2, anche se risulta essere la più diffusa, è perlopiù associata a *Pseudomonas* spp. Attualmente la distribuzione geografica delle carbapenemasi VIM ha raggiunto 17 paesi, concentrati maggiormente tra Africa ed Europa (Matsumura et al., 2017). NDM viene caratterizzata per la prima volta nel 2009 da un isolato di *K. pneumoniae* proveniente da un paziente svedese che nel 2007, durante un viaggio a Nuova Delhi, era stato ricoverato in due diversi ospedali indiani contraendo un'infezione del tratto urinario (Yong et al., 2009). Nonostante NDM-1 sia la variante più rilevante a livello globale ed è riscontrata in più specie di Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, ad oggi sono note 24 sue varianti. Grazie a meccanismi di trasferimento genetico orizzontale e alla tendenza del gene bla_{NDM} ad associarsi a lignaggi di successo tra le Enterobacteriaceae, questi enzimi sono ad oggi la tipologia di MBL più riscontrate nelle CPE in tutto il mondo (Di Pilato et al., 2022).

1.4 NDM

L'emergere delle NDM dapprima nel continente Asiatico e poi nel mondo, ha rappresentato un'ulteriore preoccupante sfida per la salute pubblica. A seguito del rilevamento del primo caso di NDM-1, uno studio ha dimostrato la diffusione del gene bla_{NDM} all'interno del subcontinente indiano, includendo India, Pakistan e Bangladesh (*Kumarasamy et al., 2010*). Successivamente, da una serie di indagini epidemiologiche che hanno interessato vari Paesi di tutti i continenti, è emersa la diffusione globale delle MBL (Figura 7) (*Wu et al., 2019*).



*Figura 7. Distribuzione mondiale delle Enterobacteriaceae NDM.
In rosso sono indicati i Paesi con incidenza di isolati NDM >5%.
In marrone chiaro sono rappresentati i Paesi con segnalazioni di ceppi NDM-positivi ma senza prove di una prevalenza del 5%.
In bianco sono indicati i Paesi senza segnalazioni o dati sui ceppi NDM-positivi.*

Fonte: Wu et al., Clinical Microbiology Reviews, Vol. 32, 2019

La presenza ormai ubiquitaria delle NDM è favorita in particolar modo dai meccanismi di trasferimento genetico, sia tra plasmidi diversi che tra plasmidi e cromosoma. Nella mobilizzazione dei determinanti di resistenza assumono un ruolo cruciale gli elementi genetici mobili, come sequenze di inserzione, trasposoni ed integroni. Il gene bla_{NDM-1} è stato trovato in varie specie di *Acinetobacter* all'interno di un trasposone composto Tn125, responsabile della trasmissione del determinante di resistenza alle Enterobacteriaceae (Wu et al., 2019). I processi evolutivi mediati da eventi di ricombinazione hanno indotto varie modificazioni a livello del trasposone, riscontrabili nell'aumento della variabilità e della capacità di diffusione di bla_{NDM} (Figura 8). A prescindere dal contesto genetico in cui si riscontra bla_{NDM} , il gene è caratterizzato da una configurazione spaziale ben precisa. A monte è sempre presente una sequenza di inserzione, la *ISAbal25*, mentre a valle si trova un gene di resistenza alla bleomicina, ble_{MBL} , seguito a sua volta da una serie di diversi geni che possono essere in forma completa o residua, come $trpF^{23}$, $dsbC^{24}$, $cutA1^{25}$, e la sequenza di inserzione *ISCR27* (Wu et al., 2019).

²³ phosphoribosylanthranilate isomerase

²⁴ disulfide bond C

²⁵ divalent Cation Tolerance protein

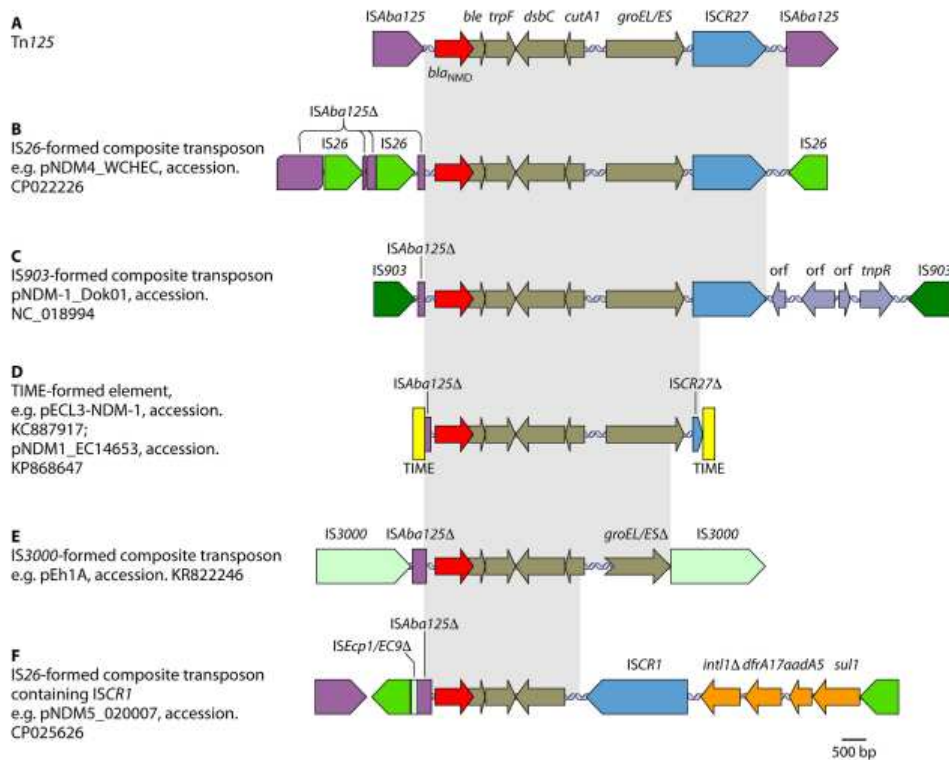


Figura 8. Esempi di contesti genetici e meccanismi di mobilitazione di bla_{NDM} .

- (A) Tn125 formato da due copie di ISAbal25.
- (B) Trasposone composito formato da due copie di IS26.
- (C) Trasposone composito formato da due copie di IS903.
- (D) Elemento formato da due copie del TIME.
- (E) Trasposone composito formato da due copie di IS3000.
- (F) Contesti genetici contenenti ISCR1. Anche questo elemento è affiancato da due copie di IS26.

Fonte: Wu et al., *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 32, 2019

Ad oggi sono noti 355 diversi plasmidi portatori di bla_{NDM} , di cui IncX3 è quello più frequentemente riscontrato tra i 20 associati alle Enterobacteriaceae. Dai dati depositati su GenBank, è emerso che la maggior parte di questi plasmidi è correlata principalmente ad *E. coli* e *K. pneumoniae*. Inoltre, nonostante questi plasmidi fossero stati segnalati sia in territorio europeo che nord americano, il loro ritrovamento in Cina e nei Paesi limitrofi ha fornito i

presupposti per definirli come veicoli importanti di trasmissione di *bla*_{NDM} nel continente asiatico (Wu *et al.*, 2019). Il plasmide pABC52-NDM-1 (Figura 9) è il principale rappresentante di questo gruppo, ed è stato segnalato in un isolato clinico di *K. pneumoniae* appartenente all’ST11 negli Emirati Arabi (Di Pilato *et al.*, 2024).

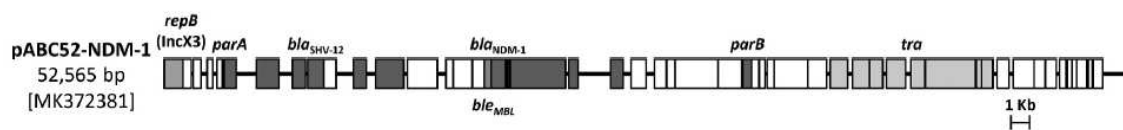


Figura 9. Organizzazione del plasmide pABC52-NDM-1 contenente i geni *bla*_{SHV-1}, *ble*_{MBL} e *bla*_{NDM-1}.

Fonte: Di Pilato *et al.*, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, Vol.22, 2024

Tra i repliconi maggiormente coinvolti nella disseminazione del gene *bla*_{NDM} è sicuramente da citare IncFII, di cui il primo è stato descritto nel plasmide pkpQIL portatore del gene *bla*_{KPC-3} e codificante per due repliconi: IncFIB_{pQil} e IncFII_{pKP91}. La capacità di codificare più origini di replicazione conferisce a questo plasmide un ampio spettro d’ospite. Su un replicone simile a IncFIB_{pQil}/IncFII_{pKP91} chiamato plasmide p2, è localizzato il gene *bla*_{NDM-1}. Questo tipo di plasmide è stato inizialmente segnalato negli Stati Uniti a partire da un isolato clinico di un paziente africano e successivamente, anche in altri paesi (Di Pilato *et al.*, 2024). Anche IncC è da annoverare tra i repliconi plasmidici implicati nella diffusione di *bla*_{NDM} essendo stato identificato in

un'ampia gamma di ospiti, tra cui sono comprese oltre che le Enterobacteriaceae anche Morganellaceae e Vibrionaceae (Wu *et al.*, 2019).

Tra le cause che hanno contribuito alla rapida diffusione globale delle carbapenemasi NDM sono da considerare i viaggi inter-continentali. È stato riscontrato infatti che quasi tutti i casi di pazienti NDM positivi nel Regno Unito mostravano una correlazione con il subcontinente indiano (Kumarasamy *et al.*, 2010). Contrariamente a quanto accade per *K. pneumoniae* produttrice di KPC, il cui successo epidemiologico mondiale è principalmente associato al ST258, ST307 e al ST11, per *K. pneumoniae* produttrice di NDM non si identifica un clone epidemico predominante, anche se l'ST11 si è reso responsabile di focolai clinici in Bulgaria, Grecia e Tunisia (Wu *et al.*, 2019).

Tra i lignaggi di maggiore rilevanza per la diffusione di bla_{NDM} sono stati inoltre segnalati l'ST14, caratterizzato da un'elevata incidenza nella penisola arabica (Moubareck *et al.*, 2018), l'ST147 presente in tutti i continenti ed endemico in India, Italia, Grecia e alcuni Paesi del Nord Africa (Peirano *et al.*, 2020) e l'ST23, spesso associato a ceppi di *K. pneumoniae* ipervirulenti e resistenti ai carbapenemi, responsabili di infezioni invasive comunitarie che hanno interessato inizialmente l'Asia e successivamente anche l'Europa e l'America (Mendes *et al.*, 2023). In Europa, anche se i livelli di maggior segnalazione di ceppi NDM riguardano Romania, Polonia e Danimarca (Albiger *et al.*, 2015),

recenti focolai di *K. pneumoniae* produttrice di NDM (NDM-Kp) sono stati riscontrati in Belgio, Italia e Grecia associati rispettivamente al ST716, ST16 e ST11 (*Bush e Bradford, 2020*). In merito all'indagine EuSCAPE, è emerso che gli isolati europei di NDM-Kp sono correlati a quattro principali lignaggi comprendente l'ST11 più ST15, ST101 e ST258/512 che costituiscono i cloni ad alto rischio, con successo epidemico e distribuzione geografica definita (*David et al., 2019*). Nel 2022, inoltre, in Germania è stato registrato un rapido aumento di casi di *K. pneumoniae* NDM-1 precedentemente segnalati in Ucraina, probabilmente correlati a rifugiati o pazienti evacuati dalla guerra, e dall'analisi del sequenziamento i principali ST associati agli isolati sono stati attribuiti agli ST147 e ST307 (*Sandfort et al., 2022*).

1.5 *K. pneumoniae*-NDM in Italia

Nell'ultimo decennio, l'Italia è stata coinvolta in un rapido aumento di casi di infezioni associate alle CPE. Dal novembre 2018 la Toscana è stata protagonista di un'epidemia a carico di Enterobacteriaceae produttrici di NDM associate al ST147, che fino agli anni prima vantavano segnalazioni occasionali, generalmente associate a focolai o viaggi in territori a rischio.

Uno studio condotto su 54 campioni di CPE produttori di NDM, isolati tra gennaio 2018 e luglio 2019 da pazienti ricoverati in 11 ospedali toscani, ha rivelato che per il 94% i casi erano attribuibili a *K. pneumoniae* e per la

rimanente parte ad *E. coli*. Dalle successive analisi genomiche condotte è emerso che 48 dei 54 ceppi esaminati, a cui è stata attribuita la causa dell'epidemia, mostravano una correlazione clonale e appartenevano ad una sottoclade di ST147 l'ST147-vir, caratterizzata dal locus capsulare KL64 più una serie di determinanti di resistenza e virulenza. I rimanenti isolati di NDM-Kp sono stati associati al ST39 produttore di NDM-1 e all'ST307 produttore di NDM-5 (Di Pilato et al., 2022) (Figura 10).

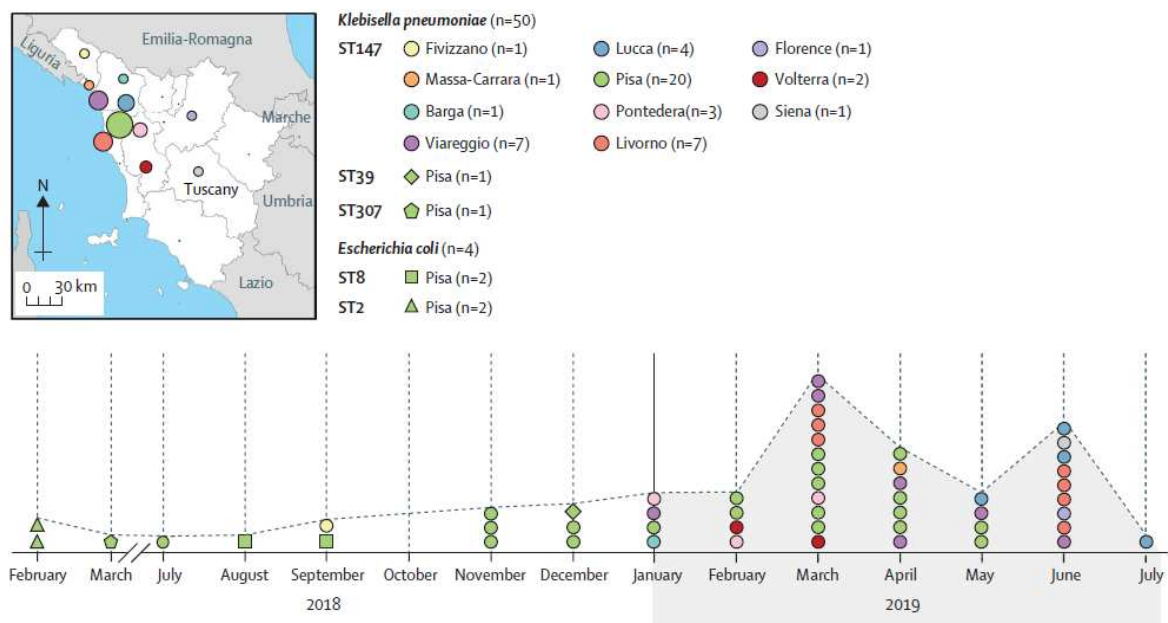


Figura 10. Distribuzione geografica delle 11 strutture sanitarie coinvolte nel focolaio e tempi di isolamento dei 54 NDM-CPE. Le strutture sanitarie di provenienza sono rappresentate con colori diversi e gli ST sono rappresentati con forme diverse. La dimensione di ciascun cerchio sulla mappa è proporzionale al numero di isolati batterici forniti da ciascun ospedale.

Fonte: Di Pilato et al. Lancet Microbe, Vol.3, 2022

Dal 2019 all'ospedale Careggi di Firenze, sono stati segnalati con frequenza casi di NDM-Kp associati all'epidemia regionale, conseguenti al trasferimento di pazienti precedentemente infetti o colonizzati da altri ospedali o strutture di lungodegenza. Dall'agosto 2021 fino a giugno 2022, l'ospedale è stato sede di un ulteriore focolaio attribuito a *K. pneumoniae* produttore di NDM-1 resistente al cefiderocol, farmaco di ultima generazione limitato al trattamento di infezioni da patogeni multiresistenti. Dei 21 isolati resistenti esaminati, tutti appartenenti al ST147 e correlati al ST147-vir presente in Toscana, 17 mostravano alterazioni a livello del gene per il recettore del sideroforo *cirA* correlato ad un elevato profilo di resistenza al cefiderocol, mentre gli altri 4 erano caratterizzati dalla presenza di mutazioni missenso riguardanti i geni *baeS* e *envZ*, responsabili della codifica di chinasi coinvolte nell'espressione dei geni di assorbimento del ferro (Coppi et al., 2022). Alla fine del 2019, durante un programma di sorveglianza epidemiologica del mobiloma presso l'IRCCS San Raffaele di Milano, sono stati isolati quattro ceppi di *K. pneumoniae* ipervirulenti da pazienti con malattia ortopedica. Gli isolati, positivi al test immunocromatografico per NDM e carbapenemasi OXA-48-like, sono stati sottoposti a sequenziamento del genoma. L'analisi dei plasmidi ha rivelato che due ceppi portavano sia il gene *bla*_{OXA-48} che il *bla*_{NDM-1}, un ceppo portava sia *bla*_{OXA-48} che *bla*_{NDM-5}, e l'ultimo presentava *bla*_{OXA-48},

*bla*_{NDM-1} e *bla*_{NDM-5}. Tra i ceppi esaminati, associati a tre diversi ST, quelli appartenenti al ST147 e ST15 mostravano un numero maggiore di geni di virulenza rispetto a quello appartenente a ST383 (Lorenzin et al., 2022). Un ulteriore focolaio di NDM ST147 è stato identificato in Puglia durante la pandemia di COVID-19. Tra il 2020 e il 2022, il programma di sorveglianza regionale CRE ha isolato 459 ceppi CR-KP da pazienti con infezioni del flusso sanguigno. Di questi, 104 erano produttori di NDM e provenivano dalle province di Bari, Barletta- Andria- Trani(BAT), Brindisi e Taranto. L'analisi genomica dei 27 ceppi NDM sequenziati ha rivelato che tutti appartenevano a ST147, suddivisi in due cladi distinti. La clade A comprendeva i ceppi isolati dalle province di Bari e BAT, correlati ai ceppi NDM-1 dell'epidemia toscana e a quelli del Medio Oriente. La clade B includeva i ceppi isolati da Brindisi e Taranto. Questi risultati hanno confermato la critica diffusione di *K. pneumoniae* ST147 produttore di NDM-1 come clone ad alto rischio per le infezioni nosocomiali (Loconsole et al., 2024).

1.5.1 Opzioni terapeutiche

Le Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi NDM rappresentano un'importante problematica a livello sanitario globale in quanto i loro fenotipi MDR rendono estremamente complesso il trattamento delle infezioni ad esse associate. Fino a pochi anni fa, le opzioni terapeutiche disponibili per le

infezioni a carico di NDM-Kp erano limitate rendendo necessario riesumare farmaci più datati e non più in uso come la colistina. Recentemente, però, la messa a punto del cefiderocol ha aperto nuove strategie terapeutiche (Di Pilato et al., 2024).

1.5.2 Colistina

La colistina, conosciuta anche come Polimixina E, è un antibiotico polipeptidico con attività battericida e concentrazione dipendente. La sua scoperta risale al 1949, quando il ricercatore giapponese Koyama la isolò da colture di *Bacillus polymyxa subspecies colistinus*. Si tratta di un polipeptide la cui struttura presenta un anello peptidico idrofilico policationico, costituito da 10 aminoacidi ed una coda idrofobica costituita da un acido grasso (Figura 11).

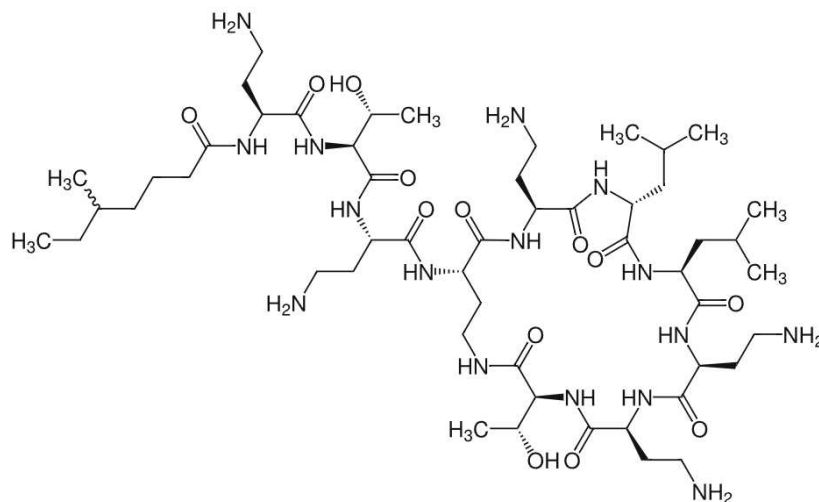


Figura 11. Struttura chimica della colistina

Nel 1958 venne utilizzata per la prima volta nella pratica clinica per il trattamento di infezioni nosocomiali associate a batteri Gram negativi MDR, ma il suo impiego fu bloccato a metà degli anni '70 per via della sua nefro- e neuro-tossicità. Il successo epidemiologico e l'estensione globale dei batteri MDR, correlati alle poche opzioni terapeutiche disponibili, hanno portato a riconsiderare la somministrazione clinica della colistina già a metà degli anni '90. Ad oggi è infatti considerato tra i farmaci di prima linea nei confronti di infezioni sostenute da batteri resistenti ai carbapenemi. Il target d'azione di questa molecola è rappresentato nel caso dei batteri Gram negativi dall'LPS presente sulla membrana esterna. L'interazione elettrostatica con la componente lipidica A determina una destabilizzazione delle molecole di LPS e indebolimento della membrana, che favoriscono l'assorbimento della colistina. L'effetto finale è quello della lisi della membrana interna con conseguente fuoriuscita del contenuto periplasmatico e citoplasmatico che conduce a morte cellulare (*El-Sayed Ahmed et al., 2020*). L'impiego della colistina è stato fortemente utilizzato nel trattamento di VAP²⁶, batteriemie ma anche di infezioni addominali e UTI. Vista però la sua variabile efficacia se somministrato come monoterapico, i nuovi protocolli clinici prevedono l'utilizzo in doppia o tripla combinazione con tigeciclina o aminoglicosidi, o

²⁶ Ventilator-associated pneumonia

tigeciclina e carbapenemi ma anche fosfomicina o aminoglicosidi. Di queste associazioni, nonostante molte siano state testate oltre che in vitro anche in vivo, non si conosce ancora quella migliore. È stato osservato che in isolati CR-KP caratterizzati da un basso livello di resistenza verso i carbapenemi, la somministrazione di colistina in combinazione ai carbapenemi presenta una discreta efficacia, al contrario dei casi di CR-KP con alti livelli di resistenza, dove viene prediletto l'impiego di colistina associata ad alti dosaggi di tigeciclina, fosfomicina e aminoglicosidi (*Karampatakis et al., 2023*). Chiaramente, il massiccio impiego di questo antibiotico ha favorito l'emergere di vari ceppi resistenti, tra i quali si denotano le Enterobacteriaceae NDM. Per *K. pneumoniae* sono noti molteplici meccanismi che mediano la mancata suscettibilità alla colistina. In alcuni casi questo fenomeno è dovuto all'acquisizione di determinanti di resistenza a localizzazione plasmidica come il gene *mcr*, isolato per la prima volta nel 2015 in Cina e diffusosi rapidamente negli anni successivi tra ceppi clinici differenti, inclusi *K. pneumoniae* e *E. coli*, in aree geografiche diverse (*Havenga et al., 2019*). In altri casi, invece, la resistenza insorge per via di mutazioni a carico di geni presenti sul cromosoma, come *mgrB* e *phoP-phoQ* codificanti per proteine transmembrana (*Wu et al., 2019*).

1.5.3 Cefiderocol

Il cefiderocol è uno dei più promettenti antibiotici di ultima generazione, efficace contro i bacilli Gram negativi MDR, tra cui *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e Enterobacterales resistenti ai carbapenemi. Il suo utilizzo viene inizialmente approvato dalla FDA nel novembre 2019 per il trattamento delle cUTI²⁷ e nel 2020 viene esteso anche al trattamento delle VAP.

La scoperta del cefiderocol risale a metà degli anni '90, quando lo scienziato giapponese Shionogi, impegnato nella ricerca di nuove molecole da utilizzare come alternative terapeutiche efficaci contro i batteri resistenti ai carbapenemi, individuò una cefalosporina siderofora provvista di una porzione catecolica con elevata attività antibatterica (*Sato e Yamawaki, 2019*). La struttura chimica del cefiderocol prevede una catena laterale al C-7, analoga a quella presente nella molecola di ceftadizima, e una catena laterale al C-3 che condivide invece con il cefepime, ma il tratto distintivo di questo antimicrobico è attribuito alla catena laterale di clorocatecolo (Figura 12). Di conseguenza, oltre ad essere attivo su un ampio spettro di batteri Gram negativi, la capacità di chelare gli ioni ferro permette all'antibiotico di entrare all'interno della cellula batterica sfruttando i rispettivi canali, così da raggiungere elevate concentrazioni a

²⁷ Complicated urinary tract infections

livello periplasmatico, riuscendo a superare vari meccanismi di resistenza come le β -lattamasi o le alterazioni della permeabilità di membrana.

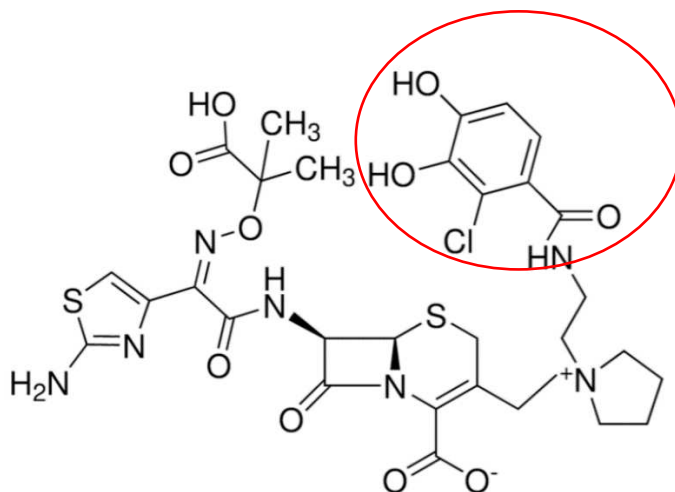


Figura 12. Struttura chimica del cefiderocol
La porzione clorocatecolica è cerchiata in rosso.

Il meccanismo d'azione del cefiderocol, appartenendo alla famiglia dei β -lattamici, si basa sull'inibizione della sintesi della parete batterica tramite legame delle PBP, di cui tendenzialmente lega la PBP-3 per cui presenta maggiore affinità, a cui consegue la morte cellulare (Soriano *et al.*, 2022). Un altro grande vantaggio di cui questa molecola è dotata, è la stabilità strutturale intrinseca contro l'idrolisi da parte di un ampio spettro di serina- e metallo- β -lattamasi, che gli conferisce ulteriore potenzialità. Proprio in merito a questo, le recenti linee guida della ESCMID²⁸ raccomandano la somministrazione del cefiderocol nei pazienti con infezioni sostenute da CR-KP produttori di MBL

²⁸ Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive

(*Karampatakis et al., 2023*). Alcuni studi hanno rivelato che l'efficienza catalitica di questa cefalosporina siderofora da parte di NDM-1 è inferiore di circa 3-10 volte rispetto a quella riscontrata per meropenem, ceftadizime o cefepime e quella di VIM-2 e IMP-1 è minore di almeno 260 volte rispetto al meropenem. Anche per KPC-3 è stata riscontrata una bassa velocità di idrolisi (*Sato e Yamawaki, 2019*). L'efficacia del cefiderocol è stata valutata eseguendo una serie di studi clinici tra i quali ARGONAUT-I²⁹, da cui è emerso che la sua attività antibatterica in vitro fosse superiore a quella di vari antibiotici testati come aztreonam e ceftadizime nei confronti di patogeni CRE (*Jacobs et al., 2019*). Nonostante l'impiego di questo farmaco di ultima generazione sia limitato e associato a casi di batteri Gram negativi DTR³⁰, sono emersi casi di microrganismi resistenti tra i quali si denotano CR-KP produttori di MBL (*Karampatakis et al., 2023*). I meccanismi mediante i quali questi ceppi risultano insensibili all'azione del cefiderocol sono complessi e non ancora completamente chiariti, per questo sono in atto degli studi che permettano una caratterizzazione più approfondita.

²⁹ Antibacterial Resistance Leadership Group [ARLG] Reference Group for the testing of Novel Therapeutic

³⁰ difficult-to-treat resistant

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

In questo studio sono stati analizzati 17 ceppi di NDM-Kp provenienti da diversi campioni clinici di pazienti ospedalizzati all'interno degli Ospedali Riuniti di Ancona. Tutti i 17 ceppi sono stati isolati dal Laboratorio di Microbiologia Clinica degli Ospedali Riuniti di Ancona tra il 2021 e il 2023. I ceppi sono stati identificati mediante tecnologia *MALDI-TOF*, che sfruttando la spettrometria di massa, identifica i microrganismi a livello di specie sulla base del profilo proteico e la presenza di geni per le carbapenemasi è stata valutata tramite il sistema *GeneXpert*, che permette una diagnosi in *Real Time PCR* e rileva le carbapenemasi più diffuse in ambiente ospedaliero (KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP).

2.2 Saggi di amplificazione

Per verificare la presenza del gene codificante per la NDM, i ceppi sono stati sottoposti a saggi di PCR³¹. Per la reazione di amplificazione di ogni campione sono stati utilizzati i primer riportati in Tabella 1 e la *Dream Taq Polimerasi* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, USA*). La fase di denaturazione è stata condotta a 94 °C, quella di annealing a 59°C (in base alle T_m ³² dei primer) e

³¹ Polymerase chain reaction

³² Temperatura di melting: temperatura alla quale il 50% dei primer è legata al template e il 50% non lo è

l'allungamento a 72 °C per 50 secondi. Infatti, la Taq polimerasi processa circa 1000 basi in 1 minuto e il nostro amplificato, ha una lunghezza di ~621 bp. I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel d'agarosio all'1% contenente 1X di *Green Gel* (*Fisher Molecular Biology, Roma, Italia*) mediante camera elettroforetica con tampone TAE, applicando una corrente di 90 Volt. Come peso molecolare standard è stato utilizzato *GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder* (*ThermoFisher Scientific*).

Gene	Designazione	Sequenza (5'-3')	T _m	Lunghezza	Referenza	Dimensione amplicone
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	59°C	20 bp	Galani et al., 2018	621 bp
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		20 pb		

Tabella 1. Primer utilizzati nello studio

2.3 Antibiotici

Per il test di sensibilità sono stati utilizzati Cefiderocol, Colistina, Aztreonam, Meropenem, Ertapenem, Imipenem-Cilastatina e Ceftadizima-Avibactam (CZA) acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Co, Milano) sotto forma di polvere. Gli antibiotici sono poi stati risospesi in un adeguato volume di acqua, ad eccezione dell'Imipenem-Cilastatina che è stato risospeso in tampone

fosfato 0,01 M e pH 7,2, in modo tale da ottenere una concentrazione finale di 10000 mg/L. Successivamente sono stati conservati a -20 °C.

2.4 Test di sensibilità

I valori di MIC (minima concentrazione inibente) agli antibiotici sono stati determinati mediante il test di microdiluizione in brodo, seguendo le linee guida indicate dall'EUCAST (<https://www.eucast.org/>). Il terreno utilizzato è il *Muller Hinton II*³³ (MH II) per tutti gli antibiotici ad eccezione del Cefiderocol, per cui è stato utilizzato il *Muller Hinton* privo di ioni ferro. I ceppi di controllo utilizzati sono *E. coli* ATCC 25922 per Colistina, Aztreonam, Ertapenem, Imipenem-Cilastatina, CZA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 per Cefiderocol e Meropenem. I valori di MIC ottenuti sono stati interpretati secondo i breakpoints stabiliti dall'EUCAST (EUCAST 2024) e riportati in tabella 2.

³³ Terreno MH con aggiunta di cationi calcio e magnesio

Antibiotico	Breakpoint Enterobacterales (mg/L)	
	Sensibile	Resistente
Cefiderocol	≤ 2	>2
CZA*	≤ 8	>8
Ertapenem	≤ 0,5	>0,5
Imipenem	≤ 2	>4
Meropenem	≤2	>8
Aztreonam	≤1	>4
Colistina	≤2	>2

Tabella 2. Breakpoints degli antibiotici utilizzati per la determinazione della MIC dei ceppi oggetto di studio.
* Per la determinazione della MIC, la concentrazione di avibactam è fissata a 4 mg/L.

2.5 Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale dei ceppi esaminati è stata condotta utilizzando il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich)*. I ceppi sono stati seminati su piastre di MacConkey (MC) agar ed incubati a 37°C per una overnight. Il giorno successivo i ceppi sono stati risospesi in 5 ml di soluzione fisiologica, così da ottenere una brodocoltura torbida. Successivamente 1,5 ml di brodocoltura vengono centrifugati per 2 minuti a 12.000 g. Conclusa la centrifuga, il sovrantante è stato eliminato ed il pellet risospeso in 180 µl di *Lysis Solution T*. Per eliminare le molecole di RNA, sono stati aggiunti 20 µl di *RNasi A Solution*, lasciata agire per 2 minuti a temperatura ambiente. 20 µl

di *Proteinasi K* (20 mg/ml) sono stati necessari per favorire la degradazione della membrana cellulare con successiva incubazione a 55°C per 30 minuti. Terminata l'incubazione, 200 µl di *Lysis solution C* sono stati aggiunti al lisato e lasciati agire per 10 minuti a 55 °C così da ottenere un composto omogeneo. Per favorire la precipitazione del DNA sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 95%. Prima di procedere con il trasferimento del campione sulla colonna, è stata eseguita la preparazione della stessa utilizzando 500 µl di *Column preparation Solution* e facendo una centrifuga di 1 minuto a 12.000 g. Il lisato trasferito sulla colonna è stato sottoposto a centrifugazione di 6.500 g per 1 minuto. Al termine della centrifuga, l'eluato è stato eliminato ed il DNA, legato alla colonna, è stato sottoposto a due lavaggi: 500 µl di *Wash Solution 1* a cui segue una centrifuga di 1 minuto a 6.500 g e 500 µl di *Wash Solution 2* a cui segue una centrifuga di 3 minuti a 12.000 g. Per rimuovere eventuali residui di etanolo rimasti all'interno della colonna, è stata eseguita una centrifuga a vuoto a 12.000 g per 1 minuto. Per lo step di eluizione finale, la colonnina è stata trasferita in una nuova eppendorf e dopo aver aggiunto 200 µl di *Elution Solution* è stata incubata per 5 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposta ad una centrifuga per 1 minuto a 6500 g. Per aumentare la resa di DNA, lo step di eluizione è stato ripetuto una seconda volta. Il DNA estratto è stato conservato a 4 °C nel caso venisse utilizzato entro una settimana o a -20 °C per

tempi più lunghi. Dopo l'estrazione, è stata valutata la quantità e la qualità del DNA estratto.

2.5.1 Qubit 4

Il *Qubit 4 (Invitrogen)* è un fluorimetro che permette una quantizzazione rapida e precisa di DNA, RNA e proteine (Figura 13). Lo strumento si basa sulla misurazione della fluorescenza emessa dal fluoroforo che si intercala nella molecola di DNA. Prima di eseguire le quantizzazioni dei DNA in esame, è stata fatta la calibrazione dello strumento. È stata eseguita una prima misurazione di una miscela costituita da 10 µl di campione standard 1 e 190 µl di *Working Solution*, che è stata sottoposta a vortex e incubata per 2 minuti a temperatura ambiente prima della lettura. La seconda misurazione è stata fatta ripetendo gli stessi passaggi su una miscela contenente 10 µl di campione standard 2 e 190 µl di *Working Solution*. Per ogni campione da quantizzare è stata preparata una miscela costituita da 2 µl di DNA estratto e 198 µl di *Working Solution*, per un totale di 200 µl. Prima della lettura al Qubit, la miscela è stata sottoposta a vortex e incubata 2 minuti a temperatura ambiente. La quantità di DNA rilevata dallo strumento è espressa in ng/µl.



Figura 13. Qubit 4 (Invitrogen).

2.5.2 Elettroforesi

Tutti i campioni di DNA estratti sono stati sottoposti ad una corsa elettroforetica così da valutarne la qualità e l'integrità. Per poter eseguire i successivi esperimenti di sequenziamento WGS, è essenziale avere un DNA con minor grado di frammentazione possibile. La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando la camera elettroforetica *Bio-rad (Hercules, California, USA)* all'interno della quale è stato inserito un gel di agarosio all'1% contenente 1X di *Green Gel (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia)*. È stato utilizzato il tampone di corsa TAE³⁴ 1X, applicando un voltaggio di 90V per 30 minuti. Terminata la corsa, il gel è stato visionato al transilluminatore. Se l'impronta lasciata dalla migrazione dei campioni sul gel è uno *smear*, ovvero

³⁴ Tris Acetato EDTA

una striscia continua e diffusa, il DNA è estremamente frammentato. Se invece sono presenti bande nette, indice di elevato peso molecolare dell'acido nucleico, la qualità del nostro campione è buona (Figura 14).

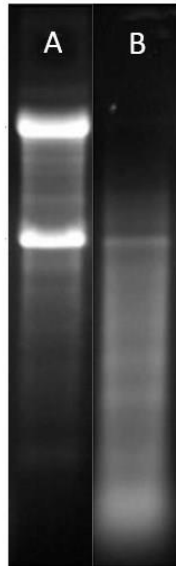


Figura 14. Confronto tra bande definite lasciate da DNA ad elevato peso molecolare (A) e smear lasciato da DNA frammentato (B).

2.6 Tipizzazione

La tipizzazione molecolare dei ceppi è stata condotta tramite *Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)* e *Multi Locus Sequence Typing (MLST)*.

2.6.1 PFGE

L'elettroforesi in campo pulsato permette l'analisi del genoma batterico, consentendo la separazione di frammenti di DNA fino a 10 Mb. I ceppi seminati su piastre di McConkey e lasciati incubare a 37°C overnight, sono stati

stemperati in un volume di 2 ml di *Suspension Buffer*³⁵ (SB) e opportunamente diluiti così da ottenere una densità ottica di 0,8 tramite misurazione allo spettrofotometro a 610 nm. Successivamente sono stati prelevati 350 µl di ogni campione e trasferiti in una eppendorf dove sono stati aggiunti ulteriori 350 µl Agarosio Low Melt al 1,6%³⁶, precedentemente sciolto al microonde. Le plugs sono state create utilizzando appositi stampi (plug-mold) all'interno dei quali sono stati versati 100 µl della miscela contenente il ceppo batterico e il low melt agarose, che è stata lasciata solidificare prima a temperatura ambiente e successivamente in frigorifero a 4°C. Una volta solidificate, le plugs sono state incubate in una provetta contenente 5 ml di *Lysis Buffer* e proteinasi K 20 mg/ml a 55°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione le plugs sono state sottoposte ad un totale di cinque lavaggi per eliminare eventuali residui di proteinasi K. I primi due lavaggi sono stati condotti con 5 ml di acqua e gli ultimi tre con 5 ml di *TE buffer*³⁷. Per ogni ceppo batterico esaminato è stata allestita una eppendorf contenente un volume totale di 200µl costituiti da 177 µl di acqua, 20 µl di *Buffer Tango* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, USA*) e 3 µl di enzima *XbaI* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, USA*) 10 U/µl, all'interno della quale è stata incubata overnight a 37°C metà plug. Terminata

³⁵ TRIS-HCl 0,1 M + EDTA 0,1 M

³⁶ 1,6% di Agar e 1% di SDS (sodio dodecilsolfato)

³⁷ TRIS-HCl 10mM + EDTA 1mM

l'incubazione, la reazione di digestione è stata bloccata aggiungendo 500µl di EDTA 0,5 M. Successivamente ogni plug è stata posizionata su un diverso dente di un pettine apposito e fissata con 30 µl di gel di *Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)* all'1% precedentemente preparato. Il pettine viene lasciato a 4°C fino a completa solidificazione delle plug. Una volta posizionato il pettine all'interno del vassoio, si procede versando il gel e si attende la solidificazione prima a temperatura ambiente, poi in frigorifero a 4°C. Prima di iniziare la corsa elettroforetica, è stato eseguito un lavaggio della camera elettroforetica con 2L di acqua. Una volta posizionato correttamente il gel all'interno della camera elettroforetica dell'apparecchiatura *Chef Mapper XA System (Biorad)* (Figura 15), sono stati versati 2L di tampone TBE³⁸ 0.5X e impostati i parametri di corsa come segue:

- Tempo: 20 ore
- Campo: 6 V/cm
- Angolo: 120°
- Switch iniziale: 2,2 secondi
- Switch finale: 54,2 secondi

³⁸ Tris Borato EDTA

- Ramping factor: lineare

Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato colorato utilizzando il bromuro d'etidio (0,5 µg/ml) e visualizzato al transilluminatore. I profili di PFGE sono stati poi confrontati tra loro in modo da stabilire eventuali correlazioni epidemiologiche. La classificazione è stata fatta secondo i criteri di Tenover (*Tenover et al., 1995*), secondo i quali i profili di restrizione che differiscono per un numero di bande minore o uguale ad uno corrispondono a ceppi strettamente correlati. Se si distinguono da due a tre bande diverse, i pulsotipi sono correlati mentre, con più di tre bande di differenza, i ceppi sono probabilmente non correlati. Per stabilire il numero e le dimensioni dei plasmidi presenti all'interno di ogni ceppo è stata effettuata una PFGE dopo aver digerito il DNA con la nucleasi S1. Questo enzima riconosce i siti di taglio presenti a livello delle Ori (origine di replicazione) dei plasmidi promuovendone la linearizzazione, così da avere la corrispondenza del peso molecolare con la migrazione sul gel. La procedura è la medesima di quella indicata per la XbaI, con alcune modifiche. La fase di digestione di metà plug avviene utilizzando *S1-nuclease (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)* ad una concentrazione di 100 U/µl per 30 minuti. Al termine la reazione viene bloccata aggiungendo 500µl di EDTA. Inoltre i parametri di corsa vengono settati come segue:

- Tempo: 20 ore

- Campo: 6 V/cm
- Angolo: 120°
- Switch iniziale: 5 secondi
- Switch finale: 30 secondi
- Ramping factor: lineare.



Figura 15. Apparecchiatura Chef Mapper XA System (Biorad) utilizzata per analisi PFGE.

2.6.2 MLST

La tecnica permette di assegnare un sequence type (ST) ai vari isolati batterici sulla base della sequenza allelica di 7 geni housekeeping. I ST sono stati ricavati dai dati di WGS (Whole Genome Sequencing) tramite il sito <https://www.genomicepidemiology.org/>

2.7. Sequenziamento

Il sequenziamento dell'intero genoma di un ceppo per ogni pulsotipo individuato al termine della PFGE è stato eseguito tramite NGS usando sia la tecnologia Oxford Nanopore che la tecnologia Illumina.

2.7.1 Long reads sequencing

Il sequenziamento del genoma mediante Oxford Nanopore MinION Mk1B sfrutta la tecnologia di sequenziamento di terza generazione, basata sulla presenza di nanopori inseriti in una membrana contenuta all'interno della flow-cell. Ai capi della membrana viene applicata una differenza di potenziale che stabilisce la creazione di una corrente elettrica. Ogni volta che una molecola di DNA attraversa un nanoporo nella membrana, determina una variazione di corrente elettrica che viene rilevata da un computer ed è differente per ogni nucleotide. Al termine del sequenziamento, tramite il processo di basecalling, la cui accuratezza viene indicata dal *Quality Score*, ogni segnale elettrico viene convertito nella base corrispondente. MinION MK1B è un sequenziatore portatile monitorato tramite il software MinKNOW™ e collegato al computer mediante porta USB, che consente un'analisi in real-time del sequenziamento in corso (Figura 16). Questa tecnologia permette di ottenere reads molto lunghe (oltre i 4 Mb) in formato fast5 e FASTQ.



Figura 16. Sequenziatore MinION MK1B.

Il funzionamento del Nanopore MinION MK1B si basa sull'impiego della flow cell, all'interno della quale sono presenti i nanopori inseriti in un chip sensore ad array, utilizzati insieme a un circuito integrato specifico (ASIC), che controlla e misura gli esperimenti. Le flow cell per Nanopore MinION, compatibili anche per il sequenziatore compatto GridION³⁹, hanno una dimensione standard di 92.4 mm x 28.0 mm x 5.8 mm e sono costituite di vari elementi:

- priming port
- SpotON port
- sensore ad array
- un canale (capacità massima pari a 2 ml)
- due porte per l'allontanamento dei rifiuti

³⁹ Strumento in grado di leggere contemporaneamente fino a 5 flow cell

- due valvole incaricate di regolare il flusso dei liquidi attraverso la cella.

I campioni (massimo 100 μ l) vengono inoculati direttamente nell'array tramite la SpotON port (Figura 17).



Figura 17. Struttura di una flow cell per MinION MK1b.

Ogni flow cell nuova contiene 512 pori ed è provvista di 2048 elettrodi disposti in maniera esagonale sulla superficie dell'array. Tutte le celle sono consegnate con lo *Storage buffer* all'interno dei canali, un liquido a base di sali e di una coppia redox che favorisce il mantenimento dell'equilibrio osmotico all'interno degli stessi, il quale viene rimosso prima di iniziare la corsa di sequenziamento e sostituito con il *Flash buffer* (FB). Una flow cell integra può essere conservata in frigorifero, ad una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 gradi, per un periodo massimo di 3 mesi mentre solamente per 30 giorni se mantenuta a temperatura ambiente. Il kit utilizzato per il sequenziamento con MinION MK1b è il *Rapid Barcoding kit* (SQK-RBK004), che permette il sequenziamento di 12 campioni

contemporaneamente, i quali possono essere poi identificati al termine della corsa grazie al precedente processo di *barcoding* che attribuisce ad ognuno di essi una specifica 'etichetta'. Questo kit contiene:

-RB01-12: *Fragmentation mix* (con trasposasi e adattatori delle trasposasi)

- RAP: *Rapid adapter* (adattatori legati a proteine motrici)

- LB: *Loading beads*

- SQB: *Sequencing buffer*

Per la preparazione della cella è stato utilizzato inoltre il *Flow Cell Priming Kit* (EXP-FLP002), contenente il *Flush Buffer* (FB) ed il *Flush Tether* (FLT). La preparazione della libreria richiede 10 minuti e una quantità di DNA di 400 ng per ogni campione. Per prima cosa si provvede allo scongelamento di RB, RAP, SQB, LB, FB, FLT, che saranno poi mantenuti in ghiaccio nelle successive fasi di preparazione. Si prosegue con la preparazione di una provetta da PCR per ogni campione contenente 7,5 µl di DNA (precedentemente diluito in modo da avere almeno 400 ng di DNA) e 2,5 µl del RB specifico. Le provette vengono poi incubate all'interno di un termociclatore a 30°C per 1 minuto e poi a 80°C per 1 minuto e al termine vengono poste in ghiaccio per raffreddarle. I diversi campioni vengono successivamente uniti in un'unica provetta da 1,5

ml, alla quale viene aggiunto un ugual volume di AMPure XP beads⁴⁰ precedentemente sottoposte a vortex per iniziare il processo di purificazione del pool di DNA. Il DNA carico negativamente si lega alle biglie cariche positivamente e la provetta viene posta su un magnete in modo da ottenere la separazione delle biglie dal sopranatante, il quale viene delicatamente rimosso. Il pellet viene lavato per due volte aggiungendo e rimuovendo 200 µl di etanolo al 70%. Al termine dei lavaggi, il pellet viene lasciato asciugare lasciando la eppendorf aperta sul magnete. La provetta viene poi rimossa dal magnete e si prosegue con la risospensione del pellet in una soluzione di 12 µl di TrisHCl-NaCl⁴¹, lasciando incubare per 2 minuti a temperatura ambiente. Successivamente la provetta viene riposizionata sul magnete e 10 µl di surnatante contenente il pool di DNA vengono prelevati e posti in una nuova eppendorf sterile a cui viene aggiunto 1 µl di RAP. A seguito di una incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, la libreria di DNA viene riposta in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo e si procede con il Priming della flow-cell. Si rimuovono 20-30 µl di Storage Buffer presenti nella flow cell con una p1000 mediante la priming port, avendo cura di non introdurre bolle d'aria all'interno della cella. Per la preparazione del Priming mix, vengono aggiunti 30 di FLT direttamente nel tubo di FB. Della soluzione ben mescolata vengono

⁴⁰ Sospensione di biglie magnetiche

⁴¹ TrisHCl 10 mM a pH 7,5-8,0 + NaCl 50 mM

prelevati 800 µl che sono inseriti nella priming port. A questo punto viene ultimata preparata la libreria per il caricamento sul dispositivo aggiungendo agli 11 µl di libreria (10 µl di pool + 1 µl di RAP):

- 34 µl di SQB

- 25,5 µl di LB (vortexare appena prima dell'uso per evitare il deposito delle biglie)

- 4,5 µl di nuclease-free water

Dopo l'apertura della SpotON port, vengono aggiunti ulteriori 200 µl di Priming Mix nella priming port. Come step finale, si inoculano goccia a goccia i 75 µl di libreria nella SpotON port. Per iniziare il sequenziamento, vengono chiuse entrambe le porte ed il MinION e viene aperto il programma MinKNOW sul computer. Il protocollo completo per un'adeguata preparazione della flow cell e della libreria è consultabile sul sito Oxford Nanopore Technologies (<https://nanoporetech.com/>).

2.7.2 Short reads sequencing

I campioni in esame sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma anche tramite la tecnologia *Illumina Miseq* basata sulla chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS). Il processo di sequenziamento si articola in quattro step principali: frammentazione, amplificazione,

sequenziamento e analisi dei dati. I campioni di DNA sottoposti a frammentazione casuale, vengono legati con degli adattatori all'estremità 5' e 3'. Gli adattatori sono provvisti di tre regioni: una permette il legame con diversi oligonucleotidi disposti all'interno dei nanopozzetti contenuti nella flow-cell in vetro, un'altra media il legame con i primer per il sequenziamento e la regione indice di circa 6-8 paia di basi, permette di distinguere i vari campioni che costituiscono la libreria di sequenziamento. Dopo una prima reazione di ibridazione tra l'oligonucleotide presente all'interno della cella e l'adattatore legato al frammento di DNA, viene sintetizzato il filamento complementare ad opera della DNA Polimerasi e successivamente eliminato il filamento originale. A questo punto avviene un'amplificazione a ponte, in cui il filamento neo sintetizzato piegandosi, consente all'adattatore libero di legarsi all'altro oligonucleotide complementare, così che la DNA polimerasi possa procedere alla sintesi del filamento opposto. Il doppio filamento viene poi denaturato, portando alla formazione di due filamenti legati alla flow cell. Questo processo è ripetuto per numerose volte, determinando la produzione di migliaia di copie identiche di ogni frammento di DNA che portano alla generazione di vari cluster. La densità di cluster determina la qualità e la resa dei dati. Ogni filamento ottenuto viene sottoposto a sequenziamento attraverso

l'utilizzo di ddNTP⁴² diversi, ognuno dei quali è legato ad un fluorocromo differente. La DNA polimerasi comincerà a sintetizzare il filamento complementare e ogni volta che viene incorporato un ddNTP, viene rilevata un'emissione di fluorescenza da un detector che tramite un software, provvederà alla conversione nella corrispondente sequenza nucleotidica. Il grande vantaggio della tecnologia Illumina risiede nella capacità di poter eseguire un sequenziamento a partire da entrambe le estremità del doppio filamento di DNA, producendo delle *paired-end* reads di qualità molto elevata. Il sistema *MiSeq Illumina* fornisce una piattaforma per il sequenziamento del DNA che integra in un unico strumento la generazione di cluster, amplificazione, sequenziamento e analisi dei dati. La macchina è caratterizzata da un ridotto ingombro ed è costituita di varie parti (Figura 18):

- computer di controllo dello strumento (interno)
- un monitor touch screen
- uno scomparto della cella a flusso
- uno scomparto per i reagenti, dove vengono posizionati i reagenti conservati ad adeguata temperatura e la cartuccia per il sequenziamento.

La cartuccia è provvista di tanti pozzetti sigillati, i quali contengono tutti i reagenti necessari per i processi che avvengono durante il sequenziamento. Nel

⁴² dideossinucleotidi

pozzetto etichettato 'Load Sample' viene caricata la libreria. Grazie alla piattaforma BaseSpace™ Sequence Hub di cui è dotato questo sistema, è possibile caricare i dati in tempo reale, monitorare la corsa tramite Internet e avere una soluzione per l'archiviazione dei dati.



Figura 18. Sequenziatore MiSeq Illumina con cartuccia e reagenti di sequenziamento.

Per la preparazione della libreria dei campioni da sottoporre a sequenziamento Illumina, è stato utilizzato l'*Illumina DNA Prep* kit. La quantità di DNA necessaria va da 100 a 500 ng. Si inizia procedendo con la standardizzazione dei campioni di DNA, diluendoli fino a 250 ng in un volume di 30 μ l di acqua ultrapura. Il primo step per la creazione della libreria prevede una fase di tagmentazione del DNA, per cui si prepara una Tagmentation Master Mix

unendo in una eppendorf 11 μ l di BLT (*Bead-linked Transposomes*) e 11 μ l di TB1 (*Tagment Buffer 1*) per ogni campione e si aliquotano 20 μ l della miscela in tante vials quante sono i campioni da sequenziare. Le vials vengono inserite nel termociclature e selezionando il programma TAG, vengono processate per 15 minuti a 55°C. Terminata la reazione, si prosegue con la fase di post-tagmentazione dove si aggiungono 10 μ l di TSB (*Tagment Stop Buffer*) in ogni campione mescolando accuratamente. Le vials vengono nuovamente riposte nel termociclature, dove viene selezionato il programma PTC e vengono incubate per 10 minuti a 37°C. Al termine, le vials vengono poste su un magnete in modo da far separare le biglie adese al DNA dal sovrnatante contenente sostanze di scarto. Dopo aver eliminato il surnatante si eseguono tre lavaggi del pellet aggiungendo e rimuovendo 100 μ l di TWB (*Tagment Wash Buffer*). Si prosegue con la fase di amplificazione del DNA tagmentato. Viene preparata la PCR Master mix unendo 22 μ l di EPM (*Enhanced PCR mix*) e 22 μ l di acqua e dispensando 40 μ l di mix in ogni campione, avendo cura di risospendere bene il pellet. A questo punto si aggiungono gli adattatori, 5 μ l di index i7 e 5 μ l di index i5 e si mescola bene. Ad ogni campione viene assegnata una coppia unica di adattatori i7-i5. I campioni vengono riposti nel termociclature dove viene selezionato il programma BLT che prevede un'incubazione a 68°C per 3 minuti, 98°C per 3 minuti, 5 cicli di 98°C per 45

secondi, 62°C per 30 secondi e 68°C per 2 minuti e al termine dei cicli 68°C per 1 minuto. Dopo l'amplificazione la libreria è pronta per essere purificata: le vials vengono riposte sul magnete e si prelevano 40 µl di sovrnatante da trasferire in provette nuove. Si aggiungono 45 µl di IPB (*Illumina Purification Beads*) e 40 µl di acqua ultrapura, si mescola bene e si lascia incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Le nuove provette vengono nuovamente poste sul magnete, si prelevano 125 µl di sovrnatante da spostare in nuove vials, dove sono già stati inoculati 15 µl di IPB. Terminati i 5 minuti di incubazione, si procede riponendo i campioni sul magnete così da eliminare il sovrnatante. Seguono poi due lavaggi aggiungendo e rimuovendo 200 µl di etanolo all'80%, al termine dei quali viene fatto asciugare il pellet. Dopo aver rimosso le vials dal magnete, per la risospensione del pellet si aggiungono 32 µl di RSB (*Resuspension Buffer*). Quindi, posizionando le provette sul magnete, si prelevano 30 µl di sovrnatante da spostare in nuove vials. 5 µl di ciascuna libreria vengono aliquotati in una nuova eppendorf per ottenere il pool di DNA da sequenziare, la cui qualità deve essere valutata prima di procedere al sequenziamento. Viene fatta dunque un'elettroforesi capillare che permette di capire la qualità e la dimensione delle librerie utilizzando lo strumento TapeStation 4150 (Agilent). Per l'esecuzione dell'elettroforesi è stata utilizzata una ScreenTape D5000 che permette di separare frammenti di DNA da 100 a

500 paia di basi. Vengono preparate 2 mix, una relativa al pool e una per il marker. In ognuna vengono aliquotati 10µl di Sample Buffer e 1 µl di pool o marker, rispettivamente. Le due mix vengono sottoposte a vortex per 1 minuto, e poi vengono inserite nello strumento. La macchina viene impostata attraverso il software TapeStation Controller. Oltre alla qualità viene anche valutata la concentrazione di ogni libreria attraverso il Qubit. Una volta ottenuti i risultati di dimensione e concentrazione del pool si procede con il calcolo della molarità

della libreria, utilizzando la formula seguente:
$$\frac{\text{concentrazione libreria } \left(\frac{ng}{\mu l}\right)}{660 \frac{g}{mol} \times \text{dimensioni libreria (bp)}}$$

Il pool viene diluito ad una concentrazione di 2 nM in un volume finale di 100 µl. Successivamente, 5 µl di libreria vengono denaturati con un uguale volume di una soluzione di NaOH 0,2 M e dopo 5 minuti, la reazione viene stoppata tramite aggiunta di 990 µl di Tris-HCl 10mM. La libreria viene ulteriormente diluita fino alla concentrazione di caricamento di 9 pM. La libreria così preparata è pronta per essere inoculata nel pozzetto specifico presente all'interno della cartuccia. È opportuno prima di provvedere al caricamento, controllare che tutti i reagenti della cartuccia siano adeguatamente scongelati. A questo punto vengono inserite la cartuccia e la flow cell nei rispettivi scomparti. È importante che la flow cell sia stata accuratamente lavata e asciugata per evitare che i liquidi in eccesso ne compromettano il funzionamento. Sono stati utilizzati i reagenti del *kit V2* con cartuccia *MiSeq*

v2 che permette di ottenere reads paired-end di una lunghezza massima di 250bp. Il protocollo completo per la corretta preparazione della libreria è consultabile sul sito Illumina (<https://www.illumina.com/>).

2.8 Analisi di sequenza

Le long reads ottenute dal sequenziamento Nanopore sono state assemblate con il software *Canu v 2.2* e sottoposte a polishing con il software *Medaka v.1.1.0*. Queste long reads assemblate sono state poi utilizzate, assieme alle short e long reads, per ottenere un assemblaggio ibrido mediante il software *Unicycler v. 0.4.8*. L'analisi del genoma è stata condotta tramite i siti BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>) sfruttando i software *ResFinder*, *PlasmidFinder*, *MLST* e *CSIPhylogeny*. L'annotazione dei genomi è stata effettuata tramite il software RAST (<https://rast.nmpdr.org/>), mentre *BRIG v. 0.95* e *EasyFig v. 2.2.5* sono stati utilizzati per la ricostruzione dei plasmidi e dei trasposoni, rispettivamente.

3. RISULTATI

3.1 Saggi di amplificazione

Tutti i 17 campioni di *K. pneumoniae* dello studio sono risultati positivi ai saggi di amplificazione condotti con i primer NDM-F e NDM-R, confermando la presenza del gene *bla*_{NDM}.

3.2 Determinazione delle MICs

In tabella 3 sono stati riportati i valori di MICs ottenuti per i 17 ceppi testati con gli antibiotici precedentemente elencati. Tutti i ceppi sono risultati resistenti a Ertapenem, Meropenem e CZA, mostrando valori di MICs superiori a 2 mg/L per il primo antibiotico e a 32 mg/L per il secondo ed il terzo, in accordo con i breakpoints EUCAST. Per quanto riguarda l'utilizzo di Imipenem-Cilastatina, tutti i ceppi hanno mostrato un profilo di resistenza all'antibiotico ad eccezione dei ceppi 715348 e 855158, i quali presentano una MIC di 0,5 mg/L (tasso di resistenza all'imipenem del 88,24%). Dei ceppi non suscettibili all'azione del carbapenemico, in particolare 4 mostrano valori di MIC di 16 mg/L, 6 hanno una MIC di 32 mg/L e 5 presentano un valore superiore a 32 mg/L. Relativamente all'Aztreonam, il 17,6% (3/17) dei ceppi analizzati risulta sensibile, con valori di MIC tra 0,25 mg/L e 0,5 mg/L. Il restante 82,4 % (14/17) è caratterizzato da un profilo di resistenza, evidenziando valori di MICs maggiori di 32 mg/L. Risultati eterogenei sono

stati ottenuti nei confronti del Cefiderocol per cui il 64,7% (9/17) dei ceppi in esame ha mostrato sensibilità all'azione dell'antibiotico, con valori di MICs compresi tra 0,5 e 2 mg/L. Il 35,3% (8/17) ha invece mostrato un fenotipo resistente nei confronti del Cefiderocol e nel caso di *Kp* 786600, si è registrata una MIC superiore a 32 mg/L. A riguardo della Colistina, tutti i ceppi di *K. pneumoniae* testati sono risultati sensibili all'antibiotico polipeptidico.

KP-NDM	Anno	MIC (mg/L)						
		Cefidercol	Colistina	Aztreonam	Meropenem	Ertapenem	Imipenem	CZA
715384	2021	1 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	0,5 (S)	>32 (R)
749587/2	2022	2 (S)	1 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	16 (R)	>32 (R)
751217	2022	1 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	16 (R)	>32 (R)
752214	2022	4 (R)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	16 (R)	>32 (R)
755644	2022	4 (R)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
759339	2022	2 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
759373	2022	4 (R)	1 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
759849/1	2022	0,5 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	16 (R)	>32 (R)
759849/2	2022	8 (R)	1 (S)	0,25 (S)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
765703	2022	1 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	>32 (R)	>32 (R)
774815	2022	16 (R)	1 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
786600	2022	>32 (R)	0,5 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	>32 (R)	>32 (R)
853489	2023	1 (S)	2 (S)	0,5 (S)	>32 (R)	>2 (R)	>32 (R)	>32 (R)
855158	2023	0,5 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	0,5 (S)	>32 (R)

860205	2023	0,5 (S)	1 (S)	2 (S)	>32 (R)	>2 (R)	32 (R)	>32 (R)
862529	2023	1 (S)	1 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	>32 (R)	>32 (R)
866736	2023	1 (S)	2 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>2 (R)	>32 (R)	>32 (R)

Tabella 3. Risultati delle MICs ottenute per i ceppi del caso di studio.
 S=sensibile
 R=resistente

3.3 Tipizzazione

I risultati degli esperimenti ottenuti con XbaI-PFGE hanno evidenziato la presenza di 8 diversi pulsotipi, indicati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla H (Figura 19).

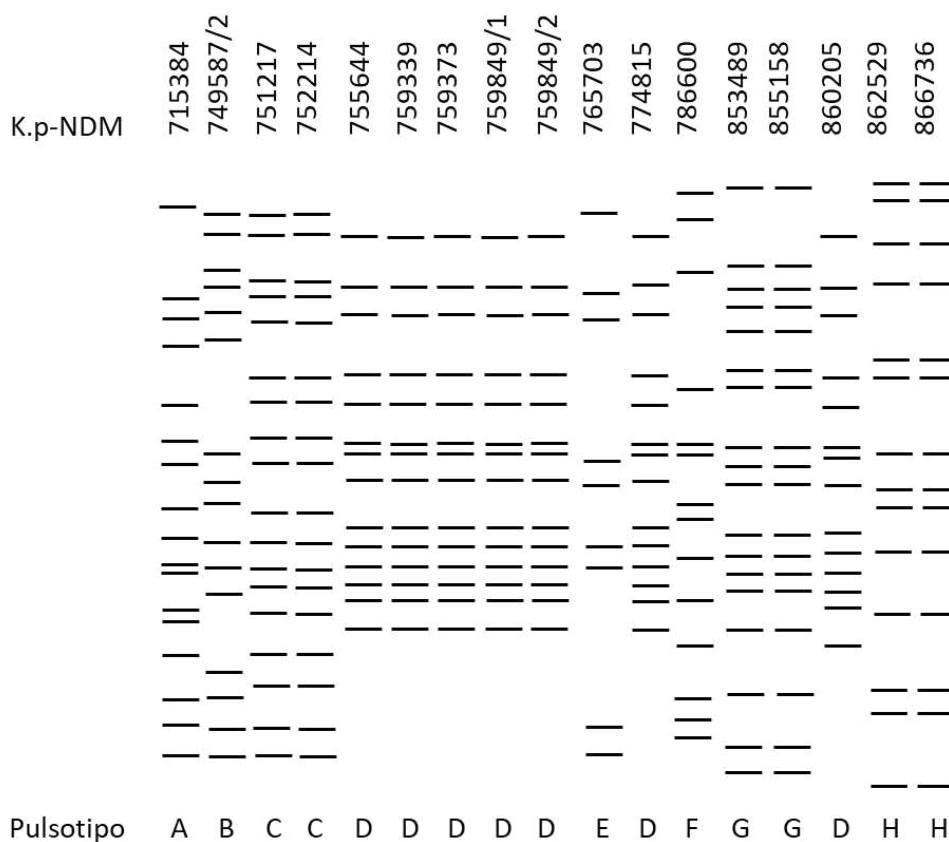


Figura 29. Profili di restrizione dei 17 ceppi di Kp ottenuti con XbaI-PFGE e pulsotipi corrispondenti.

Tra quelli individuati, il pulsotipo più rappresentato è il D, con 7 ceppi caratterizzati dallo stesso pattern di restrizione e corrispondenti ad un'incidenza del 41,17%. I pulsotipi C, G e H presentano un'incidenza dell'11,76%, contando ciascuno 2 ceppi, mentre i restanti pulsotipi sono rappresentati da un campione ciascuno (5,88%).

La S1-PFGE è stata condotta su un ceppo per ogni pulsotipo. Ciascuno degli 8 campioni presenta un profilo plasmidico differente, sia per quanto riguarda le dimensioni (da ~ 48 kb a ~ 340 kb) sia per il numero di elementi genetici mobili posseduti. Infatti, ad eccezione del ceppo 853489 che non presenta alcuna banda di restrizione, 3 campioni mostrano un solo plasmide (37,5%), in altri 3 se ne evidenziano due (37,5%) mentre nel restante ceppo sono visibili tre bande di restrizione (12,5%). I profili di restrizione ottenuti sono mostrati in Figura 20 e i risultati hanno evidenziato la presenza dei plasmidi come riportato in tabella 4.

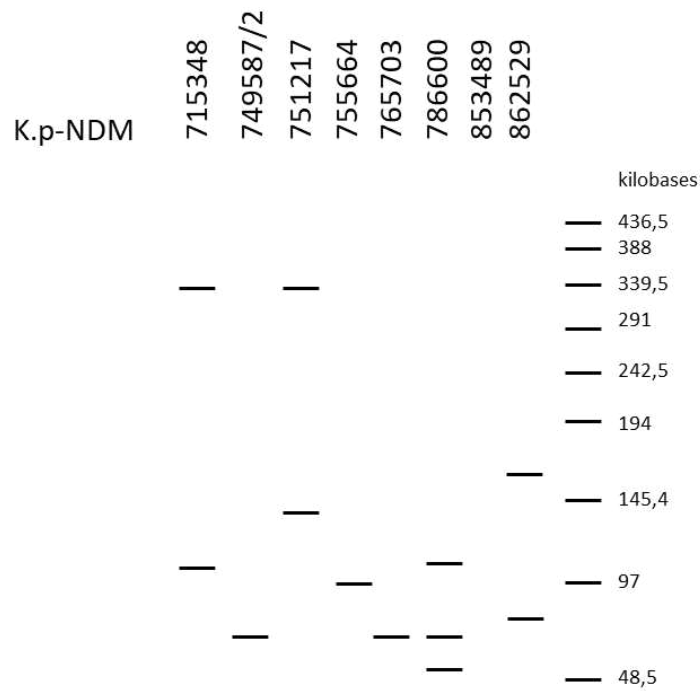


Figura 20. Pattern di restrizione degli 8 ceppi di *K.p* dello studio analizzati con S1-PFGE.

K.p-NDM	Numero plasmidi	Dimensione
715384	2	(~ 340 kb, ~ 100 kb)
749587/2	1	(~ 70 kb)
751217	2	(~ 340 kb, ~145 kb)
755664	1	(~ 100 kb)
765703	1	(~ 70 kb)
786600	3	(~ 97 kb, ~ 63,5 kb, ~ 43,5 kb)
853489	/	/
862529	2	(~ 170 kb, ~80 kb)

Tabella 4. Numero e dimensione dei plasmidi ottenuti con S1-PFGE per gli 8 ceppi esaminati.

3.4 Analisi di sequenza

I sequenziamenti Nanopore e Illumina sono stati condotti sugli 8 ceppi precedentemente sottoposti a S1-PFGE e quindi appartenenti ai diversi pulsotipi identificati mediante XbaI-PFGE.

3.4.1 MLST

L'analisi MLST ha permesso di stabilire i ST dei ceppi presi in esame, individuando 5 diverse combinazioni alleliche dei sette geni housekeeping. In particolare, i ceppi 715384 e 786600 con pulsotipi A ed F sono entrambi appartenenti al ST147, i ceppi 749587/2 e 765703 con pulsotipi B ed E appartengono al ST11 e i ceppi 755664 e 853489 anch'essi caratterizzati da due diversi pulsotipi D e G, sono riconducibili allo stesso ST395. I ceppi 751217 e 862529 contraddistinti dai pulsotipi C e H sono invece associati rispettivamente ai ST307 e ST437 (Tabella 6). Dunque gli ST147, ST11 e ST395 sono presenti con un tasso di incidenza pari al 25% ciascuno in confronto al 12,5% registrato per i singoli ST307 e ST437.

3.4.2 ResFinder

Con il software *ResFinder* è stato possibile risalire a tutti i determinanti di resistenza presenti all'interno dei genomi. Ai geni di resistenza individuati verso β -lattamici, si aggiungono quelli per i fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetracicline, fosfomicina, folati, fenicoli, sali quaternari di ammonio,

rinfamicina e bleomicina (Tabella 5). In particolare, sono state riscontrate due varianti del gene *bla*_{NDM} codificate a livello plasmidico e solo nel caso del ceppo 853489, il gene è presente all'interno del cromosoma batterico. In tabella 5 sono riportati i ceppi portatori dei geni *bla*_{NDM-1} e *bla*_{NDM-5}. Dai dati ottenuti, si può evincere come il gene *bla*_{NDM-1} sia presente con una maggiore incidenza paragonabile al 62,5% (5/8) rispetto al 37,5% relativa al gene *bla*_{NDM-5}.

Inoltre, riguardo la resistenza verso i β -lattamici, sono stati individuati anche i geni *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}. Per quanto concerne la resistenza ai fluorochinoloni, tutti i ceppi analizzati ad eccezione del 862529, sono caratterizzati dalla presenza dei geni *OqxA*, *OqxB*, codificanti per proteine di membrana coinvolti inoltre nel conferimento della resistenza ai fenicoli e ai sali quaternari, e dalle varianti geniche di *qnr*, codificanti per proteine che proteggono la DNA girasi e la topoisomerasi IV dai composti chinolonici.

Nei ceppi 715384, 749587/2, 751217, 755664 e 765703 è presente anche il gene *aac(6')-Ib-cr*, responsabile dell'inibizione degli aminoglicosidi mediante reazione di acetilazione. Nella resistenza agli aminoglicosidi sono coinvolti molteplici geni presenti in maniera eterogenea nei vari ceppi, come descritto in tabella 5. Nel caso della resistenza alla tetraciclina, l'unico ceppo avente il gene *TetA* codificante per una proteina di membrana è il 751217, mentre riguardo la resistenza alla fosfomicina, sono presenti i geni *fosA10* e *fosA6*,

appartenenti alla famiglia della glutatione transferasi. Oltre ai geni *OqxA* e *OqxB*, i geni *sul* e *dfr*, codificanti rispettivamente per una sintasi e una reduttasi, sono coinvolti nella determinazione della resistenza ai folati, mentre il gene *catA1*, codificante per un trasportatore amminoacidico, è correlato con la resistenza verso i fenicoli. Il gene *qacEdelta1* è invece associato alla resistenza verso i composti quaternari di ammonio. Solamente 3 ceppi presentano determinanti di resistenza verso i macrolidi, identificati nei geni *mrs*, *mph* ed *erm*, i primi due responsabili della produzione di una fosfotrasferasi, e l'ultimo di una metilasi. Tutti i ceppi sono caratterizzati dalla presenza di un gene *ble* associato alle metallo- β -lattamasi noto come *BRP (MBL)*, responsabile della resistenza alla bleomicina, mentre solamente i ceppi 715384, 751217, 786600 e 862529 presentano il gene *ARR*, a cui è attribuita la resistenza alla rinfapicina.

Nella resistenza agli antibiotici sono implicati inoltre il gene *ompk37*, presente solamente nei ceppi appartenenti al ST147, codificante per le porine di membrana caratteristiche delle *K. pneumoniae* responsabili della permeabilità cellulare e i geni *KpnE*, *KpnF*, *KpnG*, codificanti per le pompe di efflusso appartenenti alla superfamiglia MFS⁴³, presenti in tutti i ceppi ad eccezione del 853489.

⁴³ Major facilitator superfamily

K.p	GENI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA											EPI
	β-LATTAMICI	FLQ	AMG	TET	FOS	FOLATI	FENICOLI	MACROLIDI	QAC	RIF	BLE	
715384	blaNDM-1 blaOXA-9 blaSHV-11 blaCTX-M-15 blaTEM-1	OqxA OqxB qnrS1 aac(6')- lb-cr	aac(6')-lb-cr aac(6')-lb armA aph(3')-VI aadA1	-	fosA10	sul1 sul2 OqxA OqxB	OqxA OqxB	-	OqxA OqxB qacEdelta1	ARR-3	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG OmpK37
749587/2	blaNDM-1 blaOXA-1 blaTEM-1A blaSHV-12 blaCTX-M-15	OqxA OqxB qnrB19 aac(6')-lb-cr	aac(6')-lb-cr aac(6')-lb aadB aac(3)-IIa aph(3')-Ia	-	-	dfrA14 OqxA OqxB	OqxA OqxB	-	OqxA OqxB	-	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG
751217	blaNDM-1 blaOXA-1 blaSHV-28 blaCTX-M-15 blaTEM- 1B	OqxA OqxB qnrB1 qnrS1 aac(6')- lb-cr	rmtF aac(6')-lb-Hangzhou aac(6')-lb-cr aph(3')-VI strA strB	tetA	fosA10	sul1 sul2 dfrA5 dfrA14 OqxA OqxB	OqxA OqxB	mrs(E) mph(E)	OqxA OqxB qacEdelta1	ARR-2	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG
755664	blaNDM-5 blaSHV-11 blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaTEM-1B (x2)	OqxA OqxB aac(6')-lb-cr qnrB1	rmtB aac(6')-lb-cr aadA2 aac(3')-IId	-	fosA10	OqxA OqxB dfrA12 sul1	OqxA OqxB catA1	-	OqxA OqxB qacEdelta1	-	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG
765703	blaNDM-1 blaOXA-1 blaTEM-1A blaSHV-12 blaCTX-M-15	OqxA OqxB qnrB19 aac(6')-lb-cr	aadB aph(3')-Ia aac(6')-lb-cr aac(6')-lb aac(3'')-IIa	-	fosA10 (I91V)	dfrA14 OqxA OqxB	OqxA OqxB	-	OqxA OqxB	-	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG
786600	blaNDM-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OqxA OqxB qnrB1	strA strB	-	fosA10	OqxA OqxB sul1 dfrA14	-	mph(A)	OqxA OqxB qacEdelta1	ARR-2	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG OmpK37
853489	blaNDM-5 blaTEM-1 blaSHV-11	OqxA OqxB qnrB1	aadA2 aac(3')-IId	-	fosA10	OqxA OqxB dfrA12 sul1	OqxA OqxB catA1	-	OqxA OqxB qacEdelta1	-	BRP(MBL)	-
862529	blaNDM-5 blaCTX-M-15 blaSHV-11	-	rmtF aadA2 aac(6')-lb-Hangzhou	-	-	sul1 dfrA12	-	erm(B)	-	ARR-2	BRP(MBL)	KpnE KpnF KpnG

Tabella 5. Geni di resistenza a diverse classi di antibiotici degli 8 ceppi di Kp esaminati.

*FLQ= Fluorochinoloni, AMG= Aminoglicosidi, TET= Tetraciline, FOS= Fosfomicina, QAC= composti di ammonio quaternario, RIF= Rifampicina, BLE= Bleomicina, EPI= Inibitori pompe di efflusso

3.4.3 *PlasmidFinder*

PlasmidFinder è un software che permette di identificare i plasmidi presenti all'interno dei genomi sequenziati attraverso l'individuazione di gruppi d'incompatibilità. In questo caso, l'analisi degli 8 ceppi esaminati ha fornito una panoramica caratterizzata da elevata eterogeneità plasmidica, rilevando la presenza di vari gruppi di incompatibilità. Ad eccezione di 853489 che non presenta alcun plasmide (dato già evidenziato in S1-PFGE) ed in cui *bla_{NDM}* è a localizzazione cromosomica, in tutti gli altri ceppi è stato evidenziato almeno un plasmide. I due ceppi appartenenti al ST11 presentano lo stesso profilo plasmidico. In particolare, mostrano 3 plasmidi di cui il più grande, di 79 kb caratterizzato da IncFIA e repB, porta il gene codificante la carbapenemasi NDM. Gli altri due plasmidi sono più piccoli (75 kb e 9,2 kb) e caratterizzati dai repliconi IncL e ColRNAI rispettivamente. Non si è potuto correlare lo stesso profilo plasmidico, invece, ai due ceppi appartenenti al ST147. Infatti, 715384 presenta 3 plasmidi, di cui il più grande di 374 kb caratterizzato dai repliconi IncFIB e IncHI1B, porta il gene *bla_{NDM}*, mentre gli altri due sono di 115 kb e 39,7 kb e mostrano rispettivamente repB e IncR. 786600, invece, presenta solo 2 plasmidi: il più grande (104 kb) codifica per *bla_{NDM}* ed ha i repliconi IncFII e repB, mentre il più piccolo è di 70,8 kb ed è caratterizzato da IncR. Il plasmide codificante *bla_{NDM}* del ceppo 751217 presenta il 99% di

identità e coverage con quello di 715384: infatti mostra gli stessi gruppi di incompatibilità IncFIB e IncHI1B e dimensioni simili (360 kb). Gli altri due plasmidi codificati da 751217 sono invece diversi sia per dimensione che per replicone: uno presenta IncFIB e misura 158 kb mentre l'altro, di 149,2 kb è caratterizzato sia da IncFIB che da IncFII. Il ceppo 755664 presenta un solo plasmide IncFIB di 94,4 kb mentre 862529 ha 4 diversi plasmidi: il più grande è un plasmide ricombinante IncFIB IncFII di 179,4 kb, mentre quello codificante per *bla_{NDM}* è un IncFII da 84 kb. I restanti due plasmidi sono di 41 kb e 2 kb e caratterizzati da IncR e Col rispettivamente. In tabella 6 sono riportati le dimensioni e i gruppi di incompatibilità presenti nei plasmidi portatori del gene *bla_{NDM}* per gli 8 ceppi in esame.

K.p-NDM	Gruppi di incompatibilità plasmide <i>bla</i> _{NDM}	Dimensioni plasmide <i>bla</i> _{NDM}	ST
715384	IncFIB(pNDM-MAR) IncHI1B(pNDM-MAR) IncFIB(pQIL)	374 kb	147
749587/2	IncFIA(HI1) repB(R1701)	79 kb	11
751217	IncFIB(pNDM-MAR) IncHI1B(pNDM-MAR) IncFIB(pQil)	360 kb	307
755664	IncFIB(pQil)	94,4 kb	395
765703	IncFIA(HI1) repB(R1701)	79 kb	11
786600	IncFII(pKPX1) repB(R1701)	104 kb	147
853489	/	/	395
862529	IncFII (K)	84 kb	437

Tabella 6. Plasmidi portatori del gene *bla*_{NDM} per i ceppi analizzati con PlasmidFinder.

3.4.4 Ricostruzione dei trasposoni codificanti *bla*_{NDM}

Il gene *bla*_{NDM} è trasportato a livello di un elemento trasponibile, il trasposone Tn125. Ad eccezione del ceppo 853489 in cui questo elemento genetico portatore di *bla*_{NDM-5} è integrato all'interno del cromosoma batterico, per tutti gli altri ceppi esaminati il trasposone è presente a livello plasmidico. La regione del trasposone che ritroviamo costante in tutti i ceppi è costituita dal gene *bla*_{NDM} a cui a monte seguono il gene *ble* per la resistenza alla bleomicina

ed il gene *trpF* che codifica per una fosforibosilantranilato isomerasi. La restante parte dell'elemento trasponibile presenta differenze nella maggior parte dei ceppi esaminati (Figura 21). L'intorno genetico di *bla*_{NDM} nel ceppo 751217 è lo stesso riscontrato in 715384, appartenenti rispettivamente ai ST307 e ST147. In questo contesto, a valle del gene codificante per la carbapenemasi NDM sono presenti le sequenze di inserzione *IS630* e *ISAbA125*, mentre a monte sono identificati i geni *dsbD* implicato nella biogenesi del citocromo C, *cutA* per la tolleranza ai cationi divalenti e la sequenza di inserzione *IS6*. In 786600 a valle del gene codificante la carbapenemasi NDM c'è una sequenza di inserzione *ISAbA3000*, mentre a monte del gene *cutA*, ritroviamo i geni codificanti per due heat shock protein GroEL e GroES, seguiti da una *ISAbA3000*. I ceppi 749587/2 e 765703 appartenenti al ST11 condividono lo stesso trasposone, che vede a valle di *bla*_{NDM}, la sequenza di inserzione *ISAbA3000*, mentre a monte i geni *ble*, *trpF*, *dsdB*, un gene codificante per una ossidoreduttasi (*Gfo/Idh/MocA* family) e la trasposasi Tn3. Anche i due ceppi appartenenti al ST395 condividono lo stesso intorno genetico di *bla*_{NDM} ma in 853489 il trasposone è integrato nel cromosoma mentre in 755664 è a localizzazione plasmidica. In entrambi i casi il gene *bla*_{NDM} si trova a valle dei geni *ble*, *trpF*, *dsbD* e di una sequenza *ISCR* e a monte di una sequenza di inserzione *IsabA125*. Per quanto riguarda il ceppo 862529, sono presenti due

copie in tandem del trasposone sullo stesso plasmide. L'intorno genetico si presenta con la medesima organizzazione dei trasposoni individuati per i ceppi 755664 e 853489, a cui si aggiunge la sequenza d'inserzione *IS6* a valle del gene *bla_{NDM}* e le ORF per *IntI1*⁴⁴, *dfrA12*⁴⁵, *aadA2*⁴⁶, *qacEdelta1*⁴⁷ e *sul1*⁴⁸ che separano le due copie.

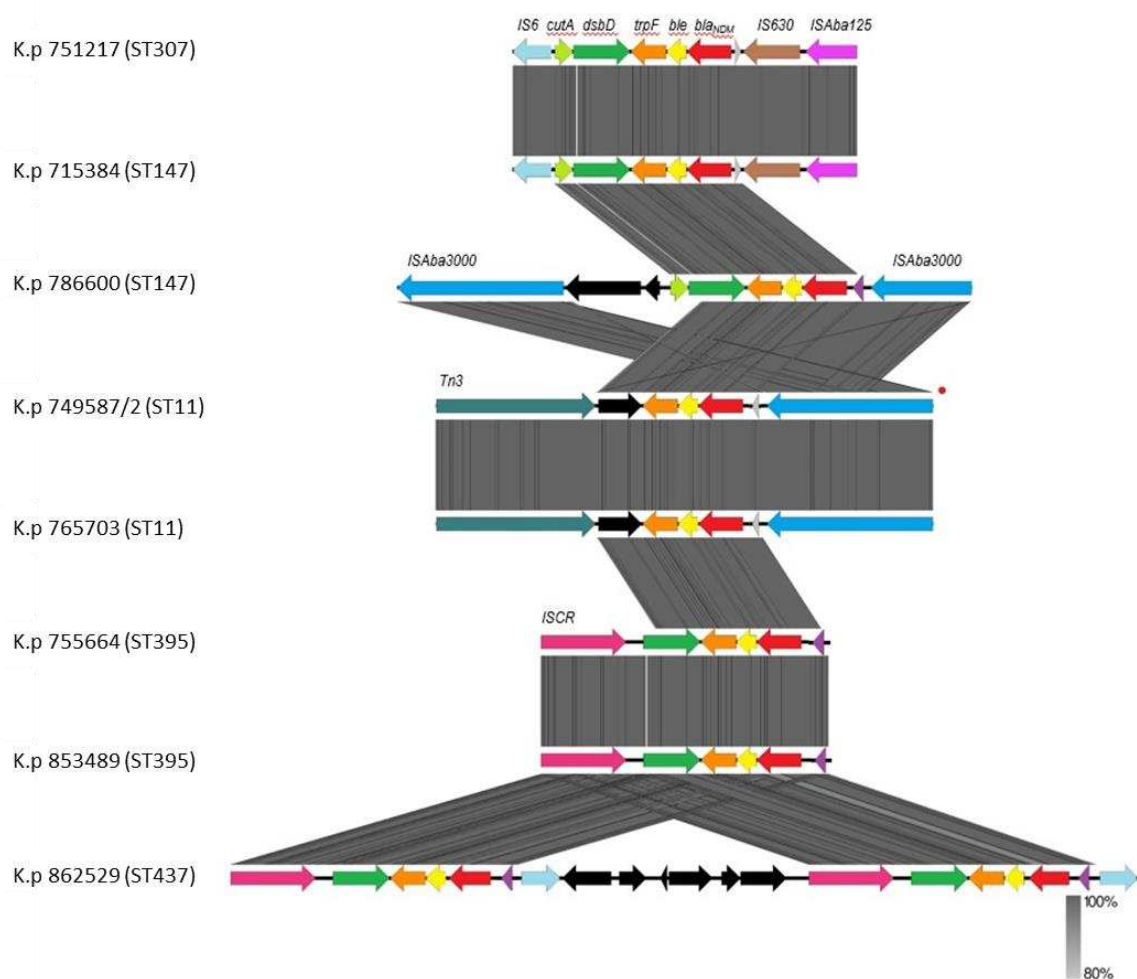


Figura 21. Confronto tra i diversi intorni genetici del trasposone Tn125 presente negli 8 ceppi di K.p.-NDM sequenziati.

⁴⁴ Integrase classe I

⁴⁵ diidrofolato reductasi codificata dall'integrone

⁴⁶ aminoglicoside nucleotidiltransferasi

⁴⁷ Gene di resistenza ad antisettici

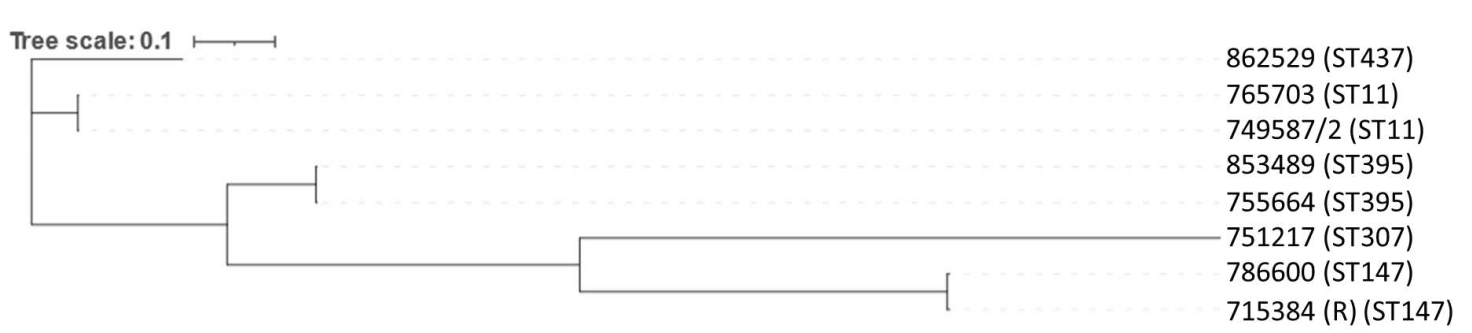
⁴⁸ diidropteroato sintasi resistente alle sulfonamidi

3.4.5 CSIPhylogeny

Il sequenziamento degli 8 campioni ha reso possibile la costruzione dell'albero filogenetico con il software *CSIPhylogeny*. L'albero è stato costruito con il metodo "maximum likelihood", per cui si ricerca la miglior topologia e lunghezza dei rami, che massimizza la probabilità di generare le sequenze osservate. Prendendo come genoma di riferimento quello del primo ceppo Kp-NDM isolato (715384), si possono distinguere 5 diversi gruppi clonali che delineano relazioni filogenetiche differenti tra i ceppi in esame (Figura 22). In particolare, i ceppi appartenenti agli stessi ST sono caratterizzati da una maggiore vicinanza filogenetica, che tende ad aumentare tra i ceppi appartenenti a ST diversi. A livello genotipico infatti, consultando la tabella degli SNPs⁴⁹, è possibile osservare come i ceppi 749587/2 e 765703 appartenenti al ST11 differiscano per soli 8 nucleotidi. Visto che per una differenza inferiore ai 21 SNPs i ceppi di *K. pneumoniae* si possono considerare come derivati dallo stesso evento filogenetico, i ceppi correlati al ST11 fanno probabilmente parte dello stesso clone epidemiologico. Per quanto riguarda i ceppi 755664 e 853489 appartenenti al ST395, la differenza di SNPs riscontrata ammonta a 65 nucleotidi, mentre per i ceppi 715384 e 786600 appartenenti al ST147, caratterizzati da una differenza di 161 nucleotidi, si evidenzia una

⁴⁹ Single nucleotide polymorphisms

distanza genotipica e filogenetica maggiore rispetto a quelle riscontrate per i precedenti ceppi appartenenti agli stessi ST. Confrontando il profilo evolutivo dei ceppi appartenenti ai diversi ST individuati, la distanza genotipica più elevata è stata riscontrata per i ceppi 862529 e 751217 rispettivamente appartenenti ai ST437 e ST307, con una differenza nucleotidica pari a 19912 SNPs.



K.p-NDM	SNPs							
	749587/2	751217	755664	765703	786600	853489	862529	715384 (R)
749587/2	0	19878	9483	8	18550	9482	6247	18559
751217	19878	0	19226	19876	18224	19233	19912	18223
755664	9483	19226	0	9483	15960	65	11792	15969
765703	8	19876	9483	0	18548	9480	6245	18557
786600	18550	18224	15960	18548	0	15947	18745	161
853489	9482	19233	65	9480	15947	0	11769	15954
862529	6247	19912	11792	6245	18745	11769	0	18754
715384 (R)	18559	18223	15969	18557	161	15954	18754	0
min: 8 max: 19912								

Figura 22. Albero filogenetico degli 8 ceppi di K.p-NDM sequenziati e tabella degli SNPs.

4. DISCUSSIONE

La diffusione di batteri patogeni multiresistenti è una delle principali minacce per la sanità moderna. Le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE) rientrano tra le maggiori preoccupazioni individuate nel 2017 dall'OMS come una delle tre principali classi batteriche per cui è richiesto un urgente sviluppo di nuovi antibiotici. Esse sono descritte ormai in tutto il mondo e sono responsabili di gravi infezioni ospedaliere, il cui tasso di incidenza ha subito un notevole aumento negli ultimi anni (*Duffy et al., 2023*). All'interno di questo vasto gruppo di batteri, occupa una posizione di spicco *K. pneumoniae*, tra i principali patogeni di maggiore rilevanza clinica per via della sua elevata propensione all'acquisizione di determinanti di resistenza a varie classi antibiotiche e responsabile di un ampio spettro di infezioni nosocomiali. A livello nosocomiale le infezioni da *K. pneumoniae* possono essere trattate con i farmaci della classe dei carbapenemi. I carbapenemi costituiscono una classe antibiotica appartenente ai β -lattamici, caratterizzati da un ampio spettro antimicrobico, con proprietà farmacologiche uniche e tipicamente impiegati come farmaci *last resort* per il trattamento di infezioni batteriche complicate (*Papp-Wallace et al., 2011*). In Europa, la maggior parte delle CR-KP produce enzimi noti come carbapenemasi, in grado di idrolizzare la molecola antibiotica inattivandola (*Nordmann e Poirel, 2019*). La diffusione ormai ubiquitaria dei

ceppi CR-KP è favorita dalla prevalente localizzazione dei geni per le carbapenemasi livello di elementi genetici mobili, quali plasmidi e trasposoni, che facilitano la trasmissione intra e inter-specie (*Kopotsa et al., 2019*). Negli ultimi dieci anni in Europa, CR-KP è diventata endemica in molti paesi. Dal 2011 al 2014 la percentuale di CR-KP nei paesi dell'UE è passata dal 6% al 7,3% e nel 2022 è stato registrato il maggiore aumento di incidenza (*EARS-Net 2022*). In particolare, i livelli più elevati di resistenza ai carbapenemi sono stati registrati in Europa meridionale e orientale e per l'Italia, il tasso di incidenza di isolati invasivi di *K. pneumoniae* resistenti a Imipenem e Meropenem è ammontato a 24,9% (*EARS-Net*). In Italia, il principale meccanismo riscontrato in CR-KP è la serino carbapenemasi KPC. In uno studio condotto da marzo a luglio 2016 dall'AR-ISS⁵⁰, l'incidenza degli isolati positivi al gene *bla_{KPC}* era pari al 96,1% (*Di Pilato et al., 2021*). Recentemente in Europa, nonostante KPC sia ancora il meccanismo prioritario responsabile della resistenza ai carbapenemi, sono state segnalate varie epidemie sostenute da ceppi CR-KP codificanti carbapenemasi diverse (*David et al., 2019*). A conferma di questo andamento epidemiologico, il nostro ospedale negli ultimi anni è stato sede di outbreak sostenuti oltre che da ceppi produttori di KPC, anche da isolati portatori di carbapenemasi di tipo OXA-48 e NDM, questi

⁵⁰ National Antibiotic-Resistance Surveillance

ultimi solitamente associati a casi sporadici o strettamente correlati a viaggi in territori a rischio. Nel nostro studio sono stati individuati 17 ceppi di *K. pneumoniae* produttori di NDM-1 e NDM-5 all'interno degli Ospedali Riuniti delle Marche. La totalità dei ceppi è caratterizzata da un fenotipo di resistenza verso ertapenem e meropenem e la combinazione ceftadizima-avibactam, mentre per l'imipenem-cilastatina e aztreonam sono stati individuati percentuali di resistenza inferiori ma comunque maggiori dell'80%. Il fenotipo riscontrato nei confronti dei carbapenemi è compatibile con il profilo genetico di β -lattamasi e carbapenemasi individuato nei ceppi in studio. Nel caso del cefiderocol, una nuova cefalosporina siderofora iniettabile, più della metà dei ceppi testati è risultata suscettibile all'azione dell'antibiotico, mentre tutti i ceppi sono risultati sensibili alla colistina. L'assenza di fenotipi di resistenza verso questa polimixina può essere dovuta alla minore pressione selettiva esercitata, a seguito di una diminuzione del suo impiego negli ultimi anni (*Brescini et al, 2021*) o alla differente epidemiologia dei ceppi NDM-positivi rispetto a quelli precedentemente circolanti negli "Ospedali Riuniti delle Marche" (ST512). Per quanto riguarda l'epidemiologia di CP-KP in Europa, i cloni ad alto rischio maggiormente rappresentati comprendono gli ST11, 15, 101 e 258/512, tutti presenti in territorio meridionale o orientale, dove sono spesso responsabili di focolai (*David et al., 2019*). In Italia è stata

descritta un'iniziale espansione clonale associata agli ST512 e ST258 appartenenti al CG258, noti principalmente per la produzione di carbapenemasi di tipo KPC. Studi successivi hanno rivelato l'affermarsi e l'evoluzione di una popolazione policlonale ad alto rischio, all'interno della quale sono stati individuati gli ST147, ST307 e ST11 (*Di Pilato et al., 2021*).

Nel nostro studio, l'analisi genomica degli 8 ceppi sequenziati ha rivelato la presenza di 5 cloni epidemici differenti, ciascuno caratterizzato da un diverso ST, e con profili plasmidici estremamente eterogenei. In particolare, la maggiore incidenza è stata riscontrata per ST147 e ST11 a cui sono associati *K. pneumoniae* produttori di NDM-1 e ST395, a cui sono correlati *K. pneumoniae* produttori di NDM-5. Il ST147 è tra i principali cloni nosocomiali recentemente affermatosi e riscontrato a livello mondiale, responsabile della diffusione di numerosi geni di resistenza, tra cui quelli codificanti per le metallo- β -lattamasi. In Italia questo clone epidemiologico si è reso responsabile di importanti epidemie in Toscana tra il 2018 e il 2019 (*Di Pilato et al., 2022*) e in Puglia tra il 2020 e il 2022 (*Loconsole et al., 2024*). Da notare la presenza di una parziale correlazione delle suscettibilità antibiotiche dei nostri ceppi con quelle dei ceppi responsabili del focolaio toscano di *K. pneumoniae* ST147 produttrici di NDM-1, contraddistinti da completa resistenza ai carbapenemi e a CZA, maggiore sensibilità alla colistina e completa suscettibilità al

cefiderocol (Di Pilato et al., 2022). Valutando la parentela clonale tra i due ceppi di *K. pneumoniae* NDM-1 ST147 del nostro studio, è emerso come nonostante facciano riferimento allo stesso clone epidemico, si tratti in realtà di due ceppi con una differenza genotipica di 161 nucleotidi, evidenziando una distanza filogenetica maggiore rispetto a quella comunemente riscontrata per ceppi responsabili dello stesso outbreak. Possiamo quindi ipotizzare che i ceppi ST147 provengano da fonti differenti e non siano riconducibili ad un unico evento clonale. Confrontando i plasmidi portatori del gene *bla*_{NDM-1} localizzato sul trasposone *Tn125*, sono state osservate differenze riguardo le dimensioni, i gruppi di incompatibilità e l'intorno genetico dell'elemento trasponibile. Il ceppo 715384 presenta infatti un plasmide di 374 kb, con i repliconi IncFIB(pNDM-MAR), IncHI1B(pNDM-MAR) e IncFIB(pQIL), mentre il ceppo 786600 porta un plasmide di 104 kb con i repliconi IncFII(pKPX1) e repB (R1701). L'unica regione dell'intorno genetico del trasposone ravvisabile in entrambi i plasmidi è quella a monte del gene *bla*_{NDM-1}, costituita dai geni *ble*, *trpF* e *dsbD*. Gli stessi gruppi di incompatibilità del plasmide di 374 kb sono stati individuati nei ceppi responsabili dell'epidemia di *K. pneumoniae* NDM-1 che ha interessato la Puglia (Loconsole et al., 2024). Rapportando i nostri risultati con i profili plasmidici dei ceppi del focolaio toscano e pugliese, è possibile notare però come nonostante l'appartenenza allo stesso sequence

type (ST147), quelli del nostro caso di studio non condividono completamente la stessa tipologia di plasmide. Questa condizione evidenzia la capacità del gene *bla*_{NDM} di inserirsi su piattaforme genetiche diverse, aumentando la diffusione del gene e la possibilità di trasferimento a cloni epidemici differenti. L'unico ceppo di *K. pneumoniae* NDM-1 appartenente al ST307, clone recentemente emerso in Europa e ormai endemico in Italia, porta lo stesso plasmide e intorno genetico del *Tn125* che caratterizzano il ceppo 715384 del ST147. Nel 2013, uno studio prospettico riguardo il monitoraggio delle CR-KP presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Bari, ha individuato *K. pneumoniae* ST307 produttori di KPC-3 come clone ad alto rischio significativamente emergente. Dall'analisi plasmidica dei ceppi in esame sono stati riscontrati i repliconi IncFIB(K), IncFIB(Mar), IncFIB(pQil) e IncN propri degli isolati ST307 (Lo Console et al., 2020), presenti in parte nel nostro ceppo ST307. Un ulteriore studio condotto presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche tra il 2018 e 2019, ha confermato l'emergenza del ST307, individuandolo come ST prevalente tra i 18 ceppi sottoposti a caratterizzazione genotipica. Degli 8 ceppi appartenenti a ST307, quattro erano *K. pneumoniae* produttori di KPC-2, di cui 3 portatori di un plasmide di circa 260 kb con stesso pattern di repliconi IncFII(K) e IncFIB(KN), mentre il restante presentava tre plasmidi di circa 120, 140 e 150 kb, con repliconi I1 γ ,

IncFII(K), IncFIB(KB) e IncFIB(KQ) (Magi et al., 2021). La presenza di carbapenemasi differenti in ceppi del clone epidemico ST307 conferma ulteriormente la capacità plastica del genoma di questo sequence type e ne spiega il successo epidemiologico come successore del CG258, come già riportato in lavori precedenti (Villa et al., 2017). Il ST11, un SLV⁵¹ del ST258, è tra i principali tipi di sequenza associati a *K. pneumoniae*-NDM e nel nostro studio rappresentano un caso particolare. Infatti, i ceppi appartenenti al ST11 sono produttori di NDM-1 e caratterizzati da una minor distanza filogenetica, con una differenza di soli 11 nucleotidi a livello del core genomico. Un così basso numero di SNPs ci conferma che i ceppi appartengono allo stesso evento epidemico e probabilmente hanno un'origine e una diffusione comune all'interno dell'azienda ospedaliera. Entrambi presentano un plasmide di 79 kb, con i due repliconi IncFIA(HI1) e repB(R1701) e viene mantenuto lo stesso contesto genetico per il trasposone. In Europa, sono stati segnalati focolai di *K. pneumoniae* ST11 produttore di NDM-1 sia in Grecia che Bulgaria (Wu et al., 2019), mentre in Italia a settembre 2019, è stato isolato un ceppo di *K. pneumoniae* produttore di NDM-1 ST11 all'interno dell'Ospedale Cardarelli in Molise (Ripabelli et al., 2020). Il profilo plasmidico dei nostri ceppi in esame presenta differenze con i dati riportati in

⁵¹ Single locus variants

letteratura, secondo i quali i plasmidi principalmente riscontrati in CR-KP ST11 produttori di KPC e NDM sono quelli di tipo IncFII, comuni negli isolati in Cina, di cui pKP0448 è il rappresentante principale, ma anche vari plasmidi appartenenti al sottogruppo IncX3, di cui pABC52-NDM-1 individuato da un isolato clinico negli Emirati Arabi, ne rappresenta il prototipo (*Di Pilato et al., 2024*). Per quanto riguarda il ST395, considerato anch'esso tra i cloni epidemiologici emergenti in Italia, nel nostro studio sono stati individuati due ceppi di *K. pneumoniae* produttori di NDM-5, i cui genomi sono caratterizzati da una differenza di 65 nucleotidi, evidenziando una stretta correlazione genetica ma non un evento clonale singolo. Infatti, i due ceppi anche se presentano lo stesso trasposone portatore del gene *bla_{NDM-5}*, ne mostrano una differente localizzazione: nel caso di 755664, il trasposone è integrato su un plasmide di 94,4 kb con il replicone IncFIB(pQil), mentre in 853489, l'elemento trasponibile è presente a livello del cromosoma batterico. Anche l'ST395 si è dimostrato essere uno dei sequence type con maggiore variabilità riguardo i geni di resistenza acquisiti. A riprova di ciò, tra dicembre 2021 e giugno 2022, il nostro ospedale è stato sede di un outbreak di *K. pneumoniae* produttori di OXA-48 ST395, clone epidemiologico solitamente associato a KPC. In particolare, in tutti i ceppi è stato riscontrato il gene *bla_{OXA-48}* all'interno del trasposone *Tn1999.2*, localizzato in un plasmide IncR di 57 kb

(D'Achille et al., 2024). L'ultimo clone epidemiologico riscontrato nella nostra analisi è il ST437, anch'esso membro del CG258 ma non comunemente circolante in Italia, dove le poche segnalazioni risalenti al periodo tra 2009 e 2011, evidenziavano la presenza di *K. pneumoniae* portatori del gene *bla*_{KPC-2} (Richter et al., 2012). La prima descrizione di *K. pneumoniae* produttori di NDM-5 ST437 nel nostro territorio è avvenuta nel settembre 2023, a seguito della caratterizzazione di due ceppi di *K. pneumoniae* MDR isolati da due diversi pazienti ricoverati nell'Ospedale dell'Aquila (Di Marcantonio et al., 2024). Oltre al gene codificante per la carbapenemasi NDM, i ceppi erano portatori di altri geni di resistenza verso i β -lattamici, macrolidi, chinoloni, rinfampicina e folati, di cui i geni *bla*_{CTX-M-15}, *ARR-2*, *sul1* e *dfrA12* erano presenti anche nel nostro ceppo. Dall'analisi dei plasmidi, sono stati riscontrati più tipi di repliconi, tra cui IncFII (K) presente anche nel plasmide di 84 kb codificante *bla*_{NDM-5} del nostro unico ceppo ST437. Il nostro studio ha evidenziato lo sviluppo di una popolazione policlonale di NDM-KP circolanti all'interno degli Ospedali Riuniti delle Marche. In particolare, a differenza degli anni passati, mentre tutti gli isolati di CR-KP erano produttori di KPC e appartenenti al gruppo clonale CG258, i risultati ottenuti confermano l'evoluzione epidemiologica già cominciata nel nostro paese, con l'aumento di incidenza di cloni emergenti associati a carbapenemasi

di tipo NDM. È chiaro come la presenza di molteplici lignaggi ad alto rischio di *K. pneumoniae* produttori di NDM-1 e NDM-5 all'interno del nostro ospedale sia fortemente influenzata dalla localizzazione del gene *bla*_{NDM} a livello del trasposone *Tn125*. Questo elemento genetico rispecchia il comportamento di tutti i trasposoni con la capacità di integrarsi oltre che a livello cromosomico anche all'interno di vari tipi di plasmidi. Questa facilità di diffusione ne permette la permanenza anche in ceppi non appartenenti allo stesso ST, aumentandone pattern di trasmissione e diffusione. La circolazione e lo sviluppo di ceppi di CR-KP rimangono dunque un grave problema sanitario da affrontare, vista la limitata disponibilità di opzioni terapeutiche efficaci nel trattamento delle infezioni ad essi associate. Tra le alternative valide da considerare vi è la colistina, antibiotico di natura lipidica il cui utilizzo nella pratica clinica fu inizialmente bloccato per via degli effetti tossici e solo recentemente riesumato come farmaco per il trattamento di infezioni sostenute da batteri resistenti ai carbapenemi (*El-Sayed Ahmed et al., 2020*). Un'ulteriore plausibile scelta ricade sul cefiderocol, una cefalosporina di ultima generazione commercializzata nel 2019 per cui però sono già stati segnalati meccanismi di resistenza (*Karakonstantis et al., 2022*) e pertanto ceppi di CR-KP non suscettibili alla sua azione, come nel nostro caso. Visto l'aumento della resistenza e della tossicità di alcune molecole antibiotiche, la combinazione di

farmaci è una opzione efficace per contrastare le infezioni da batteri multiresistenti. Data inoltre la mancanza di trattamenti specifici mirati a CR-KP, attualmente le infezioni ad esse associate sono state spesso trattate con successo con una terapia combinata a base di agenti quali polimixine, fosfomicina, tigeciclina, rifampicina e carbapenemi. L'impiego del CZA, come confermato anche dai nostri risultati, rappresenta un'alternativa inefficace nei confronti dei ceppi produttori di NDM, essendo l'avibactam un inibitore privo di attività nei confronti delle MBL. Da aprile 2024, la commissione europea ha commercializzato la combinazione del monobattamico aztreonam in associazione con l'avibactam che sembra avere risultati considerevoli contro le metallo-carbapenemasi (*Mauri et al., 2021*). Le misure di controllo più efficaci volte a ridurre l'acquisizione di infezioni causate da CR-KP, prevedono attenzione delle norme igieniche, precauzioni da contatto, pulizia dell'ambiente, identificazione precoce dei portatori asintomatici e isolamento di pazienti positivi a *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi (*Pitout et al., 2015*). La sorveglianza continua dei CRE rappresenta uno strumento fondamentale per individuare le caratteristiche epidemiologiche molecolari della resistenza agli antibiotici e fornire riferimenti per la prevenzione e il controllo delle malattie correlate, utile inoltre per la scoperta di nuovi potenziali bersagli per il trattamento dei ceppi resistenti (*Ma et al., 2023*). Il nostro studio

ha dimostrato l'affermarsi di una popolazione epidemiologica policlonale di CR-KP, evidenziando un repertorio di resistenza in continua evoluzione. Le prospettive future sono volte a mettere a punto nel più breve tempo possibile nuovi farmaci in grado di contrastare l'emergenza dei ceppi MDR. In questi anni sono stati sviluppati numerosi inibitori delle MBL, nessuno dei quali è stato però ancora approvato a livello clinico, mentre sono ancora in corso degli studi riguardo l'impiego di inibitori non lattamici delle serina β -lattamasi quali relebactam in associazione con aztreonam, la cui combinazione potrebbe essere efficace contro i ceppi NDM (*Wu et al., 2019*). Le strategie attualmente individuate per limitare la diffusione di ceppi resistenti prevedono un potenziamento delle attività di tracciamento e sequenziamento degli isolati responsabili degli outbreak, associati ad un'adeguata somministrazione degli antibiotici che possa ridurre in maniera sistematica il diffondersi di cloni epidemici difficilmente contrastabili.

5. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062
- ❖ Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 1;39(1):55-60. DOI: 10.1086/421495. Epub 2004 Jun 14. PMID: 15206053.
- ❖ Bush K and Bradford P A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016;6:a025247, DOI: 10.1101/cshperspect.a025247
- ❖ Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Feb 26;33(2):e00047-19. DOI: 10.1128/CMR.00047-19. PMID: 32102899; PMCID: PMC7048014.
- ❖ Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018; 62:e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.

- ❖ Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2016 Feb;4(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012. PMID: 26999397.
- ❖ Coppi M, Antonelli A, Niccolai C, Bartolini A, Bartolini L, Grazzini M, Mantengoli E, Farese A, Pieralli F, Mechi M T, Di Pilato V, Giani T, Rossolini G M. Nosocomial outbreak by NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* highly resistant to cefiderocol, Florence, Italy, August 2021 to June 2022. *Euro Surveill.* 2022;27(43):pii=2200795. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.43.2200795>
- ❖ D'Achille G, Nunzi I, Fioriti S, Cirioni O, Brescini L, Giacometti A, Teodori L, Brenciani A, Giovanetti E, Mingoia M, Morroni G. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaOXA-48 gene in a central Italy hospital. *J Glob Antimicrob Resist.* 2024 Sep;38:339-340. DOI: 10.1016/j.jgar.2024.07.004. Epub 2024 Jul 19. PMID: 39032696.
- ❖ David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudahab K, Goater R, Giani T, Errico G, Aspbury M, Sjunnebo S; EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group; Feil EJ, Rossolini GM, Aanensen DM, Grundmann H. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019

Nov;4(11):1919-1929. DOI: 10.1038/s41564-019-0492-8. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31358985; PMCID: PMC7244338.

- ❖ De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020 May 13;33(3):e00181-19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19. PMID: 32404435; PMCID: PMC7227449.
- ❖ Di Marcantonio S, Perilli M, Alloggia G, Segatore B, Miconi G, Bruno G, Frascaria P, Piccirilli A. Coexistence of blaNDM-5, blaCTX-M-15, blaOXA-232, blaSHV-182 genes in multidrug-resistant *K. pneumoniae* ST437-carrying OmpK36 and OmpK37 porin mutations: First report in Italy. *J Glob Antimicrob Resist.* 2024 Jun;37:24-27. DOI: 10.1016/j.jgar.2024.02.015. Epub 2024 Feb 24. PMID: 38408564.
- ❖ Di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, Del Grosso M, Antonelli A, David S, Lindh E, Camilli R, Aanensen DM, Rossolini GM, Pantosti A; AR-ISS Laboratory Study Group on carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Jan 19;76(2):355-361. DOI: 10.1093/jac/dkaa431. PMID: 33188415.

- ❖ Di Pilato V, Henrici De Angelis L, Aiezza N, Baccani I, Niccolai C, Parisio EM, Giordano C, Camarlinghi G, Barnini S, Forni S, Righi L, Mechi MT, Giani T, Antonelli A, Rossolini GM; Tuscan Clinical Microbiology Laboratory Network. Resistome and virulome accretion in an NDM-1-producing ST147 sublineage of *Klebsiella pneumoniae* associated with an outbreak in Tuscany, Italy: a genotypic and phenotypic characterisation. *Lancet Microbe*, 2022 Mar;3(3):e224-e234. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00268-8. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35544076.
- ❖ Di Pilato V, Pollini S, Miriagou V, Rossolini GM, D'Andrea MM. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the role of plasmids in emergence, dissemination, and evolution of a major clinical challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2024 Jan-Jun;22(1-3):25-43. DOI: 10.1080/14787210.2024.2305854. Epub 2024 Feb 12. PMID: 38236906.
- ❖ Duffy N, Li R, Czaja CA, Johnston H, Janelle SJ, Jacob JT, Smith G, Wilson LE, Vaeth E, Lynfield R, O'Malley S, Vagnone PS, Dumyati G, Tsay R, Bulens SN, Grass JE, Pierce R, Cassidy PM, Hertzfel H, Wilson C, Muleta D, Taylor J, Guh AY. Trends in Incidence of Carbapenem-Resistant Enterobacterales in 7 US Sites, 2016–2020. *Open Forum Infect Dis*, 2023 Dec 5;10(12): ofad609. DOI: 10.1093/ofid/ofad609. PMID: 38130598; PMCID: PMC10734676.

- ❖ El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):868-885. DOI: 10.1080/22221751.2020.1754133. PMID: 32284036; PMCID: PMC7241451.

- ❖ European Centre for Disease prevention and Control (ECDC), *Surveillance report* 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-antimicrobial-resistance.pdf>

- ❖ European Centre for Disease prevention and Control (ECDC), *Surveillance report* 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf>

- ❖ Havenga B, Ndlovu T, Clements T, Reyneke B, Waso M, Khan W. Exploring the antimicrobial resistance profiles of WHO critical priority list bacterial strains. *BMC Microbiol.* 2019 Dec 23;19(1):303. DOI: 10.1186/s12866-019-1687-0. PMID: 31870288; PMCID: PMC6929480.

- ❖ Hobson CA, Pierrat G, Tenailon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, Jacquier H, Birgy A. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview.

Antimicrob Agents Chemother. 2022 Sep 20;66(9):e0044722. DOI: 10.1128/aac.00447-22. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35980232; PMCID: PMC9487638.

- ❖ Jacobs MR, Abdelhamed AM, Good CE, Rhoads DD, Hujer KM, Hujer AM, Domitrovic TN, Rudin SD, Richter SS, van Duin D, Kreiswirth BN, Greco C, Fouts DE, Bonomo RA. ARGONAUT-I: Activity of Cefiderocol (S-649266), a Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria, Including Carbapenem-Resistant Nonfermenters and Enterobacteriaceae with Defined Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Dec 21;63(1):e01801-18. DOI: 10.1128/AAC.01801-18. PMID: 30323050; PMCID: PMC6325197.
- ❖ Karakonstantis S, Rousaki M, Kritsotakis EI. Cefiderocol: Systematic Review of Mechanisms of Resistance, Heteroresistance and In Vivo Emergence of Resistance. *Antibiotics* (Basel). 2022 May 27;11(6):723. DOI: 10.3390/antibiotics11060723. PMID: 35740130; PMCID: PMC9220290.
- ❖ Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics* (Basel). 2023 Jan 21;12(2):234.

DOI: 10.3390/antibiotics12020234. PMID: 36830145; PMCID: PMC9952820.

- ❖ Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Dec;1457(1):61-91. DOI: 10.1111/nyas.14223. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31469443.
- ❖ Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010 Sep;10(9):597-602. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2. Epub 2010 Aug 10. PMID: 20705517; PMCID: PMC2933358.
- ❖ Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1584-90. DOI: 10.1128/AAC.43.7.1584. PMID: 10390207; PMCID: PMC89328.

- ❖ Loconsole D, Accogli M, De Robertis AL, Capozzi L, Bianco A, Morea A, Mallamaci R, Quarto M, Parisi A, Chironna M. Emerging high-risk ST101 and ST307 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones from bloodstream infections in Southern Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020 Jun 1;19(1):24. DOI: 10.1186/s12941-020-00366-y. PMID: 32487201; PMCID: PMC7266126.

- ❖ Loconsole D, Sallustio A, Sacco D, Santantonio M, Casulli D, Gatti D, Accogli M, Parisi A, Zagaria R, Colella V, Centrone F, Chironna M. Genomic surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* reveals a prolonged outbreak of extensively drug-resistant ST147 NDM-1 during the COVID-19 pandemic in the Apulia region (Southern Italy). *J Glob Antimicrob Resist*. 2024 Mar;36:260-266. DOI: 10.1016/j.jgar.2024.01.015. Epub 2024 Jan 26. PMID: 38280719.

- ❖ Lorenzin G, Gona F, Battaglia S, Spitaleri A, Saluzzo F, Trovato A, di Marco F, Cichero P, Biancardi A, Nizzero P, Castiglione B, Scarpellini P, Moro M, Cirillo DM. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy. *J Glob Antimicrob Resist*, 2022 Mar; 28:146-150. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.01.001.

- ❖ Lyman M, Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Limbago B, Kallen A. Notes from the Field: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Producing OXA-48-like Carbapenemases--United States, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015 Dec 4;64(47):1315-6. DOI: 10.15585/mmwr.mm6447a3.
- ❖ Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, Zhang W, Zhang Y, Shen A, Sun H, Li L. Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiol Res.* 2023 Jan; 266:127249. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127249. Epub 2022 Nov 4. PMID: 36356348.
- ❖ Magi G, Tontarelli F, Caucci, S, Sante L. D, Brenciani A, Morroni, G, Mingoia, M. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* ST307 Recovered from Fecal Samples in an Italian Hospital. *Future Microbiology*, 2021; 16(10), 703–711. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0246>
- ❖ 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. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for

- acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988.
- ❖ Matsumura Y, Peirano G, Bradford PA, Motyl MR, DeVinney R, Pitout J. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:3034 –3038. <https://doi.org/10.1093/jac/dky303>.
 - ❖ Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, Pitout JDD. Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2249-2258. DOI: 10.1093/jac/dkx148. PMID: 28520983; PMCID: PMC5890710.
 - ❖ Mauri C, Maraolo AE, Di Bella S, Luzzaro F, Principe L. The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. *Antibiotics (Basel).* 2021 Aug 20;10(8):1012. DOI: 10.3390/antibiotics10081012. PMID: 34439062; PMCID: PMC8388901.
 - ❖ Mendes G, Santos ML, Ramalho JF, Duarte A, Caneiras C. Virulence factors in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2023 Nov 30;14:1325077. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1325077. PMID: 38098668; PMCID: PMC10720631.

- ❖ Mohammed I. El-Gamal, Imen Brahim, Noorhan Hisham, Rand Aladdin, Haneen Mohammed, Amany Bahaaeldin, *European Journal of Medicinal Chemistry* Volume 131, 5 May 2017, Pages 185-195, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>
- ❖ Moubareck CA, Mouftah SF, Pál T, Ghazawi A, Halat DH, Nabi A, AlSharhan MA, AlDeesi ZO, Peters CC, Celiloglu H, Sannegowda M, Sarkis DK, Sonnevend Á. Clonal emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST14 co-producing OXA-48-type and NDM carbapenemases with high rate of colistin resistance in Dubai, United Arab Emirates. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Jul;52(1):90-95. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.003. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29530587.
- ❖ Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Sep 21;10(9):1140. DOI: 10.3390/antibiotics10091140. PMID: 34572722; PMCID: PMC8465816.
- ❖ Papp-Wallace K M, Endimiani A, Taracila M A and Bonomo R A. Carbapenems: Past, Present, and Future, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011 Nov; 55(11): 4943–4960. DOI: 10.1128/AAC.00296-

- ❖ Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Sep 21;64(10):e01148-20. DOI: 10.1128/AAC.01148-20. PMID: 32747358; PMCID: PMC7508593.
- ❖ Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:5873–5884. DOI: 10.1128/AAC.01019-15.
- ❖ Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004 Jan;48(1):15-22. DOI: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004. PMID: 14693513; PMCID: PMC310167.
- ❖ Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr;44(4):891-7. DOI: 10.1128/AAC.44.4.891-897.2000. PMID: 10722487; PMCID: PMC89788.

- ❖ Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1597-606. DOI: 10.1093/jac/dks121. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22499996.
- ❖ Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents,* 2015 Jun;45(6):568-85. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25857949.
- ❖ Rahmati Roodsari M, Fallah F, Taherpour A, Hakemi Vala M, Hashemi A. Carbapenem-Resistant Bacteria and Laboratory Detection Methods. *Arch Pediatr Infect Dis.* 2014;2(1): 188-191. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.5193>
- ❖ Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, Cavallaro A, Palù G. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog,* 2012 Jul 16;4(1):7. DOI: 10.1186/1757-4749-4-7. PMID: 22800501; PMCID: PMC3411510.
- ❖ Ripabelli G, Sammarco ML, Salzo A, Scutellà M, Felice V, Tamburro M. New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST11: first identification in a hospital of

- central Italy. *Lett Appl Microbiol.* 2020 Dec;71(6):652-659. doi: 10.1111/lam.13384. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32916001.
- ❖ Sandfort M, Hans JB, Fischer MA, Reichert F, Cremanns M, Eisfeld J, Pfeifer Y, Heck A, Eckmanns T, Werner G, Gatermann S, Haller S, Pfennigwerth N. Increase in NDM-1 and NDM-1/OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Germany associated with the war in Ukraine, 2022. *Euro Surveill.* 2022 Dec;27(50):2200926. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.50.2200926. PMID: 36695468; PMCID: PMC9808319.
 - ❖ Sato T, Yamawaki K. Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. *Clin Infect Dis.* 2019 Nov 13;69(Suppl 7):S538-S543. DOI: 10.1093/cid/ciz826. PMID: 31724047; PMCID: PMC6853759.
 - ❖ Soriano MC, Montufar J, Blandino-Ortiz A. Cefiderocol. *Rev Esp Quimioter.* 2022 Apr;35 Suppl 1(Suppl 1):31-34. DOI: 10.37201/req/s01.07.2022. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35488822; PMCID: PMC9106201.
 - ❖ Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9. DOI:

10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995. PMID: 7494007; PMCID: PMC228385.

- ❖ Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Apr;55(4):1485-93. DOI: 10.1128/AAC.01275-10. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21282452; PMCID: PMC3067157.
- ❖ van Duin D, Arias CA, Komarow L, Chen L, Hanson BM, Weston G, Cober E, Garner OB, Jacob JT, Satlin MJ, Fries BC, Garcia-Diaz J, Doi Y, Dhar S, Kaye KS, Earley M, Hujer AM, Hujer KM, Domitrovic TN, Shropshire WC, Dinh A, Manca C, Luterbach CL, Wang M, Paterson DL, Banerjee R, Patel R, Evans S, Hill C, Arias R, Chambers HF, Fowler VG Jr, Kreiswirth BN, Bonomo RA; Multi-Drug Resistant Organism Network Investigators. Molecular and clinical epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacterales in the USA (CRACKLE-2): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jun;20(6):731-741. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30755-8.
- ❖ van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017 May 19;8(4):460-469. DOI:

10.1080/21505594.2016.1222343. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27593176; PMCID: PMC5477705.

- ❖ Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, Endimiani A, Mammina C, Ocampo AM, Jimenez JN, Doumith M, Woodford N, Hopkins K, Carattoli A. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genom.* 2017 Apr 26;3(4):e000110. DOI: 10.1099/mgen.0.000110. PMID: 28785421; PMCID: PMC5506382.
- ❖ Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L and Wang H, The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, 17, 6278; DOI: 10.3390/ijerph17176278
- ❖ World Health Organisation (WHO). <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- ❖ Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev*, 2019; 32: e00115-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>.

- ❖ Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009 Dec;53(12):5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09. Epub 2009 Sep 21. PMID: 19770275; PMCID: PMC2786356.