

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.2 Diffusione	4
1.3 Contesto genetico	7
1.4 Scopo della ricerca	8
2. MATERIALI E METODI.....	10
2.1 Ceppi batterici.....	10
2.2 Terreni di coltura e principali sostanze chimiche utilizzate	10
2.3 Tecniche di determinazione della sensibilità agli antibiotici	11
2.3.1 Test qualitativi di diffusione in agar.....	12
2.3.2 Test quantitativi per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).....	14
2.3.3 Test fenotipici per evidenziare l'attività carbapenemasi (mCIM)	15
2.4 Tecniche di analisi genotipica	16
2.4.1 Estrazione del DNA genomico.....	17
2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
2.4.3 PCR multiplex.....	20
2.4.4 Elettroforesi su gel d'agarosio	20
2.5 Tecniche di tipizzazione.....	21
2.5.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	22
2.6 Sequenziamento	25
3. RISULTATI.....	27
3.1 Determinazione della sensibilità agli antibiotici	27
3.2 Tipizzazione molecolare	28
3.3 Tipizzazione molecolare mediante PFGE	29
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	33
5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	36

1. INTRODUZIONE

La resistenza agli antibiotici costituisce uno dei problemi più rilevanti per la salute pubblica a livello globale. Il continuo incremento della resistenza, soprattutto tra i batteri Gram-negativi, desta grande preoccupazione.

In risposta a questa emergenza sanitaria, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stilato nel 2017 una classificazione dei microrganismi resistenti agli antibiotici, suddividendoli in tre gruppi a seconda della priorità con cui è necessario sviluppare nuove terapie antibiotiche, riportati in Tabella 1.

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

Tabella 1 - Classi di priorità R&D (Tacconelli, Lancet WHO, 2018).

Il gruppo di priorità 1 include batteri resistenti ai carbapenemi, una classe di antibiotici β -lattamici di ultima generazione per i quali le opzioni terapeutiche disponibili sono molto limitate, anche a causa della riduzione degli investimenti nella ricerca e sviluppo farmaceutico.

Nella famiglia delle *Enterobacteriaceae* i meccanismi responsabili della resistenza agli antibiotici carbapenemi sono diversi e comprendono: l'inattivazione enzimatica, la modificazione del bersaglio, la modifica o la mancanza dei sistemi di

ingresso dell'antibiotico (come le porine), l'espressione di pompe di efflusso, spesso in associazione a fattori di resistenza quali le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) o le β -lattamasi cromosomiche AmpC. Questi meccanismi non sono esclusivi e possono coesistere nello stesso batterio.

Il meccanismo più rilevante ai fini clinici è la produzione di carbapenemasi, enzimi in grado di degradare i carbapenemi. I geni codificanti per queste carbapenemasi si trovano spesso su elementi genetici mobili, principalmente plasmidi coniugativi, che facilitano la diffusione della resistenza.

Inoltre, sono emersi e si stanno diffondendo globalmente diversi gruppi di enzimi con proprietà strettamente carbapenemasiche. Alcuni di questi enzimi idrolizzano i carbapenemi in modo molto efficiente, mentre altri mostrano una minor attività.

Le carbapenemasi differiscono anche per profilo di inibizione: alcuni enzimi possono essere inibiti da specifiche molecole sia β -lattamiche (come l'acido clavulanico e il tazobactam) che non (come l'avibactam).

Dal 1991, anno in cui è stata scoperta la prima carbapenemasi, IMP, in un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa*, sono stati identificati altri quattro principali tipi di enzimi: VIM, KPC, OXA-48 e derivati, e NDM, ciascuno con le proprie caratteristiche idrolitiche e spettro d'azione.

Gli enzimi carbapenemasi, come tutte le β -lattamasi in generale, vengono classificati in base a diversi criteri: sito attivo (serina o cofattore metallico), profilo di substrato e struttura molecolare (**Bush, 2018**). Quest'ultima caratteristica distingue gli enzimi in quattro classi indicate con le lettere A, B, C e D. Tale classificazione è indicata come classificazione di Ambler.

La Tabella 2 (**Eichenberger, 2019**) presenta le principali β -lattamasi in base a questi criteri di classificazione. Le classi A, C e D hanno un residuo di serina nel sito attivo, mentre gli enzimi di classe B hanno un cofattore metallico nel sito attivo, lo zinco, e per questo sono chiamate metallo- β -lattamasi.

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

Tabella 2 – Classificazione di Ambler delle β -lattamasi.

1.1 New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)

La carbapenemasi più recente è la New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), un nuovo tipo di metallo- β -lattamasi codificata dal gene *bla*NDM-1. Si tratta di una β -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) in grado di idrolizzare la maggior parte dei β -lattamici, tra cui penicilline, cefalosporine e carbapenemi, per i quali ha un'elevata concentrazione minima inibente, con l'eccezione dell'Aztreonam, che riesce a mantenere la sua attività antibiotica.

NDM-1 strutturalmente è un polipeptide a catena singola composto da 270 amminoacidi, con un peptide segnale N-terminale di 28 amminoacidi.

Secondo la nomenclatura in uso, le MBL vengono denominate in base alla città o regione di origine del primo isolato. In questo caso si parla di New Delhi metallo- β -lattamasi (NDM) in quanto questo gene di resistenza è stato scoperto per la prima volta nel 2008 in un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* isolato da un paziente svedese in trattamento a New Delhi, in India (**Yong, 2009**).

A partire dal 2008, il sistema di monitoraggio dei batteri resistenti ai carbapenemi dell'*Health Protection Agency* (HPA), attivo dal 1998, ha registrato un notevole aumento dei ceppi produttori di carbapenemasi nel Regno Unito (**Pittalis, 2011**).

Il gene *bla*NDM è stato successivamente rintracciato in diversi ceppi appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*, ai generi *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, portando all'individuazione di 24 varianti del gene (Wu 2019).

I ceppi NDM-produttori sono responsabili di diverse infezioni, spesso con alti tassi di mortalità. La loro diffusione a livello globale rappresenta una sfida notevole per la gestione clinica e la salute pubblica.

In India i batteri che possiedono il gene *bla*NDM-1 rappresentano tra l'1% e il 13% delle *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi. I pazienti affetti sviluppano prevalentemente infezioni urinarie e polmoniti acquisite in comunità, ma sono comuni anche infezioni gravi correlate a procedure mediche, come batteriemie e polmoniti associate alla ventilazione meccanica (Pittalis, 2011).

1.2 Diffusione

In seguito alla scoperta di NDM-1, un'indagine successiva ha evidenziato la presenza diffusa del gene *bla*NDM-1 nel subcontinente indiano, comprendendo paesi come India, Pakistan e Bangladesh. Da quel momento, è stato accertato che i ceppi NDM-positivi sono ormai presenti a livello globale (Wu, 2019).

Il primo focolaio in Europa è stato segnalato in Italia a partire dal 2011. Il gene *bla*NDM-1 era stato individuato in ceppi clinici di *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli* isolati da diversi pazienti. Da allora il numero delle segnalazioni è andato aumentando.

In **Figura 1** si osserva come il gene *bla*NDM è ormai diffuso in ogni continente.

Sono evidenziati in rosso i paesi in cui è rilevata una prevalenza di ceppi NDM-positivi pari o superiore al 5%, tra cui Egitto, India, Pakistan, Serbia ed Emirati Arabi Uniti. In marrone chiaro sono indicati i paesi con segnalazioni riguardo la presenza di ceppi NDM-positivi, senza un'evidente prevalenza pari o superiore al 5%. In bianco sono indicati i paesi privi di segnalazioni o dati relativi a ceppi NDM-positivi.

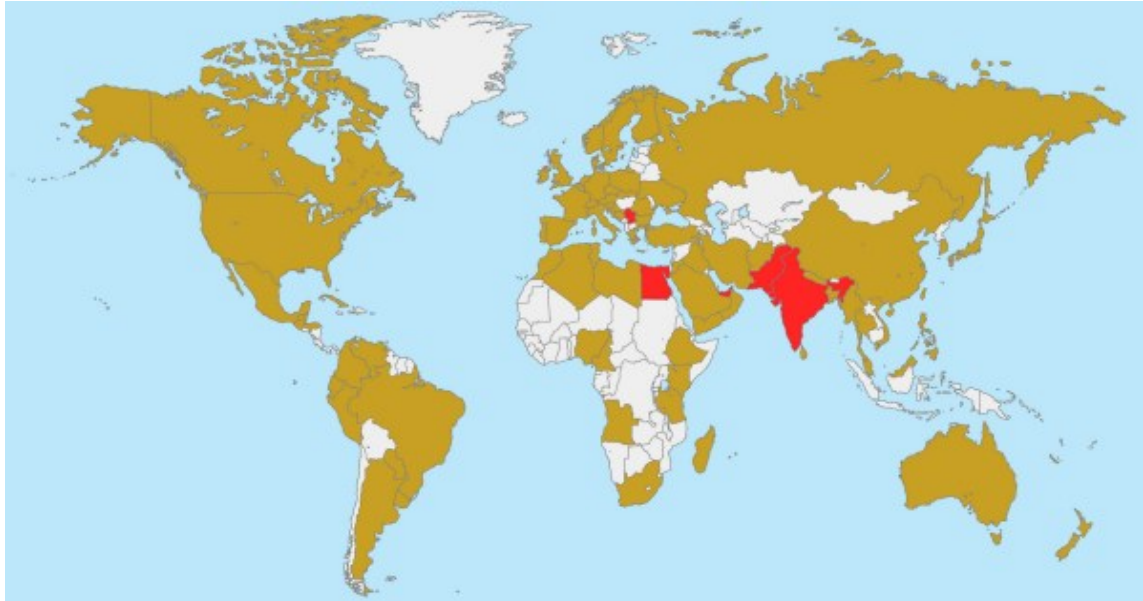


Figura 1 - Distribuzione mondiale di ceppi *Enterobacteriales* NDM-positivi (Wu 2019).

Secondo la letteratura, il gene *bla*_{NDM} è presente principalmente in ceppi *Enterobacteriaceae*, tra cui la specie più riscontrata è *Klebsiella pneumoniae*, che rappresenta oltre la metà degli isolati. A seguire, si trovano *Escherichia coli* e il complesso *Enterobacter cloacae*.

Le principali caratteristiche legate all'epidemiologia degli enzimi NDM, come quella delle altre carbapenemasi, sono le seguenti:

1. Il primo parametro è il serbatoio primario. Infatti, è molto probabile che un enzima specifico emerga in una determinata area geografica dove esistono condizioni predisponenti, come un'alta densità di popolazione, scarse condizioni igieniche e una forte pressione selettiva legata all'abuso e all'uso scorretto degli antibiotici.
2. Il secondo parametro riguarda la genetica del gene della carbapenemasi, poiché alcune strutture genetiche sono inclini a migliorare la sua mobilità. Alcuni plasmidi possiedono un ampio spettro di ospiti per la replicazione e possono quindi favorire la disseminazione tra specie diverse, mentre altri plasmidi possiedono uno spettro di ospiti ristretto. Alcuni plasmidi si replicano in modo molto efficiente e sono autotrasmissibili, mentre altri non

lo sono o coniugano a un ritmo molto basso. Anche il *background* genetico del ceppo che ospita il gene della carbapenemasi può svolgere un ruolo importante, poiché l'emergere di un gene in un clone di successo (ad esempio con caratteristiche di virulenza o di maggiore capacità di adattamento ambientale) può favorire la diffusione iniziale di una carbapenemasi.

3. Il terzo parametro principale riguarda il livello degli scambi di popolazione umana una volta costituito un serbatoio. Se l'emergere di una carbapenemasi avviene in un'area geografica in cui la popolazione è mobile, la probabilità di vedere emergere quel determinante di resistenza a livello globale è alta.

La diffusione dei geni delle carbapenemasi è spiegata dalla combinazione di questi tre parametri.

I ceppi di *Escherichia coli* NDM-positivi appartengono a diversi *sequence type* (ST), senza una predominanza di ST specifici, a differenza di quelli KPC-produttori (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi), che appartengono per lo più al clone pandemico internazionale ST131, già associato con la diffusione del gene per la produzione della ESBL CTX-M-15. La percentuale di ceppi NDM-positivi appartenenti a ST131 non è altrettanto rilevante.

Contrariamente, ST167 è altamente prevalente tra i ceppi di *E. coli* NDM-positivi, rappresentando il 14,4% dei genomi NDM-positivi disponibili. Questo ST è stato segnalato in diversi paesi, tra cui India, Niger, Sud Africa, Corea del Sud, Svizzera e Stati Uniti, principalmente da campioni clinici umani. Due ulteriori tipi, meno comuni rispetto a ST167, sono ST617 e ST410. Questi ceppi sono stati segnalati in vari paesi e sono stati isolati anche da animali. In uno studio condotto in più località in Cina, il ST167 si è confermato come il ceppo NDM-positivo di *E. coli* più comune, seguito dal ST410. Come segnalato nel report ECDC del 2023, otto ST di *E. coli* (ST167, ST410, ST405, ST361, ST648, ST617, ST156 e ST46) sono tra i dieci più frequenti sia nei database di pubblico dominio che nelle raccolte nazionali (**ECDC, 2023**).

1.3 Contesto genetico

Il gene *bla*_{NDM} è stato individuato in diversi contesti genetici, suggerendo che molteplici meccanismi abbiano contribuito alla sua mobilizzazione e diffusione.

In questi contesti genetici è presente una regione conservata costituita da una sequenza di inserzione *ISAba125* (intatta o troncata) a monte di *bla*_{NDM} e da un gene di resistenza alla bleomicina, *ble*_{MBL}, a valle (**Figura 2**). A valle di quest'ultimo, sono stati identificati altri geni, in forma completa o parziale, tra cui *trpF* (che codifica per l'enzima fosfo-ribosil-antranilato isomerasi), *dsbC* (codificante per una proteina ossido riduttasi), *cutA1* (o *dct*, che codifica una proteina per la tolleranza ai cationi bivalenti) e la regione di inserzione *ISCR27*.

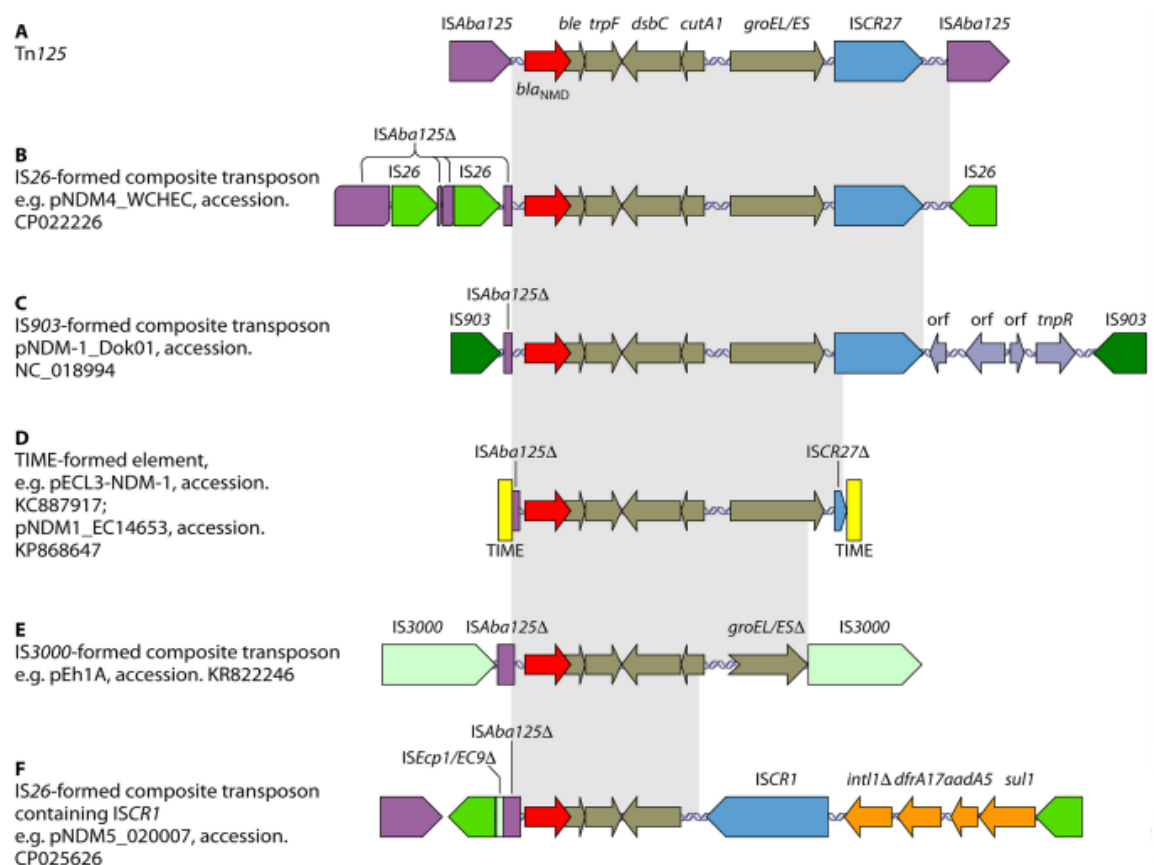


Figura 2 – Esempi di contesti genetici e meccanismi di mobilizzazione *bla*_{NDM} (Wu, 2019).

In *Acinetobacter* è presente una seconda copia di IS*Aba125*, a valle di IS*CR27*, portando alla formazione di un trasposone composito chiamato *Tn125*. (**Fig. 2A**).

Il core centrale del contesto genetico di *bla*NDM-1, tipicamente con IS*Aba125* a monte e *ble*MBL a valle, è condiviso da altre varianti alleliche del gene (es. *bla*NDM-5), suggerendo che esse possano essere derivate da mutazioni puntiformi. Le differenze riguardano principalmente le regioni fiancheggianti.

Sebbene i geni *bla*NDM possano essere mappati sui cromosomi batterici, la maggior parte di essi è veicolata da plasmidi, che giocano pertanto un ruolo cruciale nella disseminazione. Gli oltre 300 plasmidi identificati e sequenziati appartengono a diverse famiglie o gruppi di incompatibilità Inc: IncC, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL/M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY e ColE10. Questo risultato suggerisce che non vi è una stretta associazione con replicon specifici e che le acquisizioni sono state molteplici ed indipendenti, favorendo la diffusione attuale della carbapenemasi NDM (**Wu, 2019**).

1.4 Scopo della ricerca

Dopo le prime segnalazioni avvenute in Italia nel 2011, nel 2018-2019 è stato segnalato un notevole aumento dei ceppi NDM-produttori, con focolai epidemici in particolare nell'area nord-occidentale della Toscana (**Tavoschi, 2020**). La loro rapida propagazione è stata probabilmente favorita dalla pressione selettiva indotta dall'impiego dell'antibiotico Ceftazidime-Avibactam ed ha coinvolto numerosi ospedali, in particolare quelli di Lucca, Livorno, Massa-Carrara, Pisa e Pontedera.

Le caratteristiche genetiche, quali l'elevata variabilità dei contesti genetici e l'aumento della prevalenza nell'ambiente, potrebbe aver favorito la maggiore diffusione.

Anche nella nostra regione è stata osservata una situazione analoga. Dalle prime segnalazioni sporadiche a partire dal 2018, nell'agosto del 2023 sono stati isolati ceppi multiresistenti di *Escherichia coli* produttori di NDM, da vari materiali clinici di pazienti ricoverati presso aree diverse dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ancona.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di condurre una dettagliata caratterizzazione fenotipica e genotipica di tali ceppi ed un'analisi epidemiologia della circolazione di specifici cloni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

In questo studio sono stati analizzati 4 ceppi batterici di *Escherichia coli*, riportati nella Tabella 3.

Ceppo	ID	Campione clinico	Reparto	Anno di isolamento
NDM 1	858511	Tampone rettale	Nefrologia - Salesi	2023
NDM 2	859655	Tampone rettale	Medicina generale – Torrette	2023
NDM 3	859720	Tampone rettale	Medicina generale – Torrette	2023
NDM 4	860001	Tampone rettale	Medicina generale – Torrette	2023

Tabella 3 – Dati relativi ai ceppi esaminati.

Questi ceppi sono stati identificati presso il laboratorio di Microbiologia degli Ospedali Riuniti Torrette di Ancona mediante la tecnologia MALDI-TOF (Matrix-Assisted Desorption/Ionization-Time of Flight).

2.2 Terreni di coltura e principali sostanze chimiche utilizzate

Mueller Hinton Agar (MHA): terreno standard utilizzato per valutare la sensibilità dei microrganismi agli antibiotici tramite il metodo di diffusione su dischetto. È formato da estratto di carne, digerito acido di caseina, amido e Agar.

Cysteine-Lactose-Electrolyte-Deficient agar (CLED): utilizzato per isolare e contare i batteri nelle urine. È un terreno differenziale che consente il rilevamento della fermentazione del lattosio da parte di microrganismi fermentanti grazie alla presenza di blu di bromotimolo (un indicatore di pH). I nutrienti principali sono gelatina, peptone di caseina ed estratto di manzo.

MacConkey agar (MC): terreno di coltura selettivo per i batteri gram-negativi, che vengono differenziati in base al metabolismo del lattosio; in particolare, i batteri

lattosio-fermentanti (es. *Escherichia coli*) formano colonie rosse con un'area circostante di precipitazione dei sali biliari, mentre i batteri lattosio-non fermentanti danno origine a colonie incolori o trasparenti. I componenti principali includono il colorante cristalvioletto, sali biliari, lattosio e rosso neutro (indicatore di pH).

Azide blood agar: terreno di coltura selettivo a base di sodio azide, da usare con sangue defibrinato di montone, per l'isolamento dei cocchi Gram positivi da campioni clinici e da altri materiali.

Brain Heart Infusion Broth (BHB): terreno di coltura liquido non selettivo contenente infuso di cuore e cervello di origine bovina o suina, cloruro di sodio, glucosio e sodio fosfato bifasico. È progettato per supportare la crescita e il mantenimento di batteri con requisiti nutrizionali particolarmente elevati. Questo brodo, arricchito con il 20% di glicerolo, può essere utilizzato per conservare i ceppi batterici a -70°C per periodi di media e lunga durata.

Oltre ai terreni di coltura, sono state utilizzate anche le seguenti soluzioni.

Tris-Acetato-EDTA (TAE): buffer utilizzato nell'elettroforesi su gel di agarosio per separare acidi nucleici come DNA e RNA. È costituito da una miscela di Tris-acetato, solitamente a pH 8.0, e EDTA, che lega i cationi bivalenti.

Tris-Borato-EDTA (TBE): tampone di corsa della Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), particolarmente utile nella separazione di piccoli frammenti di DNA (peso molecolare < 1000), ad esempio piccoli prodotti risultanti dalla digestione con enzimi di restrizione. Il TBE ha una migliore capacità tamponante e fornisce una più accurata risoluzione del buffer TAE.

2.3 Tecniche di determinazione della sensibilità agli antibiotici

Durante lo studio sono state analizzate le caratteristiche fenotipiche dei ceppi batterici mediante le diverse procedure riportate in seguito, ottenendo risultati riguardanti la loro sensibilità o resistenza agli antibiotici.

2.3.1 Test qualitativi di diffusione in agar

L'antibiogramma è un esame microbiologico utilizzato per saggiare la sensibilità di un microrganismo ad uno o più farmaci antimicrobici. Viene spesso eseguito con la metodica di agar-diffusione, indicata anche come tecnica Kirby-Bauer.

Procedimento

- Allestire una coltura pura del ceppo in esame su un terreno adeguato e incubare overnight a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Il giorno seguente, con un tampone, prelevare una quantità di ceppo e sospenderla in MHB, in modo da diluirla al fine di ottenere una densità ottica di 0.1 (misurata alla lunghezza d'onda di 625 nm), corrispondente a circa 1×10^8 Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml)
- Con un tampone sterile distribuire uniformemente l'inoculo su una piastra di MHA e aggiungere dischetti imbevuti di antibiotici
- Mettere la piastra in incubatore a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per tutta la notte
- Al termine di questo periodo si potrà osservare una crescita microbica relativamente uniforme, con zone di inibizione di varie dimensioni intorno ai dischetti di antibiotico. L'ampiezza di queste zone permette di valutare la suscettibilità del batterio ai vari antibiotici testati. Per determinare con precisione la sensibilità batterica, si misura il diametro delle zone di inibizione in mm, confrontando i valori ottenuti con i valori di *breakpoint*.

Gli antibiotici testati ed i relativi *breakpoints* sono riportati di seguito (**Tabella 4**).

Antibiotico	Concentrazione dischetto (μg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
		S	R
Amoxicillina + Acido clavulanico (AUG)	20+10	≥ 19	< 19
Amikacina (AK)	30	≥ 18	< 18
Aztreonam (ATM)	30	≥ 26	< 21
Cefepime(FEP)	30	≥ 27	< 24
Cefotaxime (CTX)	5	≥ 20	< 17
Ceftazidime (CAZ)	10	≥ 22	< 19
Cloramfenicolo (CHL)	30	≥ 17	< 17
Ciprofloxacina (CIP)	5	≥ 25	< 22
Ertapenem (ETP)	10	≥ 25	< 25
Gentamicina (CN)	10	≥ 17	< 14
Imipenem (IMI)	10	≥ 22	< 17
Meropenem (MER)	10	≥ 22	< 16
Tobramicina(TOB)	10	≥ 16	< 16
Trimetoprim-Sulfametoxazolo (SXT)	25	≥ 14	< 11

Tabella 4 - Valori di riferimento per l'interpretazione dei diametri di inibizione di *E. coli* (EUCAST, 2019).

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

La Minima Concentrazione Inibente (MIC) è un parametro che quantifica l'efficacia di un antibiotico contro uno specifico batterio; rappresenta la concentrazione più bassa dell'antibiotico necessaria per impedire la crescita visibile del batterio.

Il test viene condotto su una piastra microtiter con 96 pozzetti, lavorando sotto cappa a flusso laminare per garantire la sterilità.

Procedimento

- Diluire l'antibiotico in MHB fino ad ottenere una concentrazione doppia rispetto alla massima che si desidera testare.
- Per le sospensioni batteriche, preparare un inoculo standardizzato (1×10^8 UFC/ml).
- In tutti i pozzetti della piastra, tranne che nella prima colonna, aggiungere 50 μ l di MHB. Nella prima colonna, invece, dispensare 100 μ l dell'antibiotico da testare.
- Effettuare diluizioni scalari partendo dalla prima fino alla penultima colonna, poiché l'ultima colonna è destinata al controllo positivo della crescita batterica, contenente solo terreno e ceppo batterico.
- Aggiungere 50 μ l della sospensione batterica precedentemente preparata.
- Incubare le microtiter a 37°C per una notte e, al termine, leggere i risultati. La MIC corrisponde alla concentrazione di antibiotico presente nel primo pozzetto in cui non si osserva più crescita batterica.

È importante preparare anche una piastra con una sospensione batterica di un ceppo di riferimento ATCC (American Type Culture Collection), nello specifico *Escherichia coli* ATCC 25922, che funge da controllo di qualità e viene trattato esattamente come il ceppo in esame.

I risultati vengono interpretati secondo i valori di *breakpoint* (EUCAST), riportati in tabella 5.

Antibiotico	MIC breakpoints ($\mu\text{g/L}$)	
	S	R
Amikacina (AK)	≤ 8	> 8
Aztreonam (ATM)	≤ 1	> 4
Cefepime(FEP)	≤ 1	> 4
Cefiderocol (FDC)	≤ 2	> 2
Colistina (COL)	≤ 2	> 2
Ciprofloxacina (CIP)	$\leq 0,25$	$> 0,5$
Ertapenem (ETP)	$\leq 0,5$	$> 0,5$
Gentamicina (CN)	≤ 2	> 2
Imipenem (IMI)	≤ 2	> 4
Meropenem (MER)	≤ 2	> 8
Tigeciclina (TGC)	$\leq 0,5$	$> 0,5$

Tabella 5 - Valori di riferimento per l'interpretazione dei valori di MIC per *E. coli* (EUCAST, 2019).

2.3.3 Test fenotipici per evidenziare l'attività carbapenemasi (mCIM)

L'mCIM è un test fenotipico finalizzato alla rilevazione di carbapenemasi, enzimi sintetizzati da microrganismi in grado di inattivare i carbapenemi (Pierce, 2017). Quando un dischetto di Meropenem (MER) da 10 μg viene messo a contatto con una sospensione di un microrganismo che produce carbapenemasi, il carbapenemico nel dischetto viene degradato. Al contrario, se il microrganismo non produce carbapenemasi, l'antibiotico conserva la sua efficacia antimicrobica anche dopo l'incubazione con la sospensione batterica.

Procedimento

- Prelevare 1 μl del ceppo batterico e sospenderlo in 2 ml di Tryptic Soy Broth (TSB), un terreno di coltura ricco utilizzato per rilevare, isolare e far crescere vari microrganismi, inclusi batteri e funghi difficili da coltivare. Agitare al vortex per 10 secondi.
- In condizioni sterili, aggiungere un dischetto contenente 10 μg di Meropenem e incubare per 4 ore \pm 15 minuti a una temperatura di $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

- Poco prima della fine dell'incubazione preparare una sospensione batterica con una torbidità corrispondente allo standard 0,5 di McFarland, usando il ceppo indicatore di Escherichia coli ATCC 25922.
- Distribuire in modo omogeneo questa sospensione su una piastra MHA, con l'aiuto di un tampone sterile.
- Alla fine dell'incubazione, rimuovere il dischetto di Meropenem dalla sospensione batterica utilizzando un'ansa da 10 µl.
- Posizionare il dischetto sulla piastra MHA precedentemente inoculata e incubare di nuovo per 18-24 ore a 35°C ± 2°C.

Al termine dell'incubazione viene misurato il diametro dell'alone di inibizione del ceppo di Escherichia coli ATCC 25922 nei confronti del dischetto di MEM messo a contatto con i ceppi in esame. Un alone di inibizione con un diametro compreso tra i 6 mm e i 15 mm è considerato un risultato positivo. Un diametro compreso tra i 16 mm e i 18 mm è considerato un risultato intermedio, ed è quindi opportuno effettuare ulteriori analisi. Un diametro di inibizione maggiore di 19 mm è considerato un risultato negativo.

Diametro alone di inibizione	Risultato
6-15 mm	Positivo
16-18 mm	Intermedio
≥19 mm	Negativo

Tabella 6 – Interpretazioni risultati mCIM (Pierce, 2017).

2.4 Tecniche di analisi genotipica

I ceppi batterici presi in esame sono stati analizzati anche dal punto di vista genotipico, principalmente per evidenziare la presenza di geni di resistenza. Questa analisi è stata effettuata su DNA batterico, previa estrazione, mediante la tecnologia Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.4.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit GenElute Bacterial Genomic DNA, fornito dalla ditta Sigma-Aldrich, seguendo le istruzioni del protocollo per batteri Gram-negativi, come descritto di seguito.

Procedimento

- Preparare una sospensione batterica del ceppo da analizzare sciogliendo una quantità sufficiente di colonia prelevata da una coltura pura fresca in 1,5 ml di soluzione fisiologica all'interno di una provetta Eppendorf.
- Centrifugare per 2 minuti a 12.000-16.000 x g.
- Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet con 180 µl di Lysis Solution T.
- Aggiungere 20 µl di RNasi A Solution, mescolare e lasciare incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- Aggiungere 20 µl di Proteinasi K Solution, mescolare e incubare per 30 minuti a 55°C.
- Aggiungere 200 µl di Lysis Solution C e incubare per 10 minuti a 55°C.
- Posizionare la colonnina fornita dal kit in una provetta Eppendorf da 2 ml, aggiungere 500 µl di Column Preparation Solution, centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto e scartare il filtrato.
- Aggiungere 200 µl di etanolo assoluto al lisato e mescolare con un vortex.
- Trasferire il lisato nella colonnina precedentemente preparata, centrifugare a 6500 x g per 1 minuto e scartare il filtrato.
- Spostare la colonnina in una nuova provetta Eppendorf, aggiungere 500 µl di Wash Solution 1, centrifugare a 6500 x g per 1 minuto e scartare il filtrato.
- Aggiungere 500 µl di Wash Solution Concentrate, centrifugare alla massima velocità per 3 minuti e scartare il filtrato.
- Centrifugare di nuovo la colonnina per 1 minuto alla massima velocità.
- Spostare la colonnina in una nuova provetta Eppendorf e aggiungere 200 µl di Elution Solution.

- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare a 6500 x g per 1 minuto.
- Conservare il filtrato finale (200 µl), che contiene il DNA genomico purificato, a -20°C.

2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La reazione a catena della polimerasi, nota come PCR, è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare una specifica sequenza di DNA, consentendo di ottenere rapidamente in vitro la quantità di materiale genetico necessaria per varie applicazioni. Il processo di amplificazione si svolge attraverso un numero prestabilito di cicli, generalmente 30-40, ciascuno composto da tre fasi fondamentali che avvengono a temperature diverse:

1. Denaturazione (94°C) → fase di separazione dei due filamenti di DNA stampo tramite riscaldamento. Le elevate temperature permettono la rottura dei legami ad idrogeno tra le basi azotate del DNA target, provocando la separazione dei filamenti.

2. Annealing → fase di appaiamento dei due primers. La temperatura di annealing varia in base alla composizione dei primers e alla temperatura di melting (T_m), la temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA si trova in forma di doppia elica e l'altro 50% in forma di singola elica. La T_m è calcolata con la formula:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

Di solito, la temperatura di annealing utilizzata è inferiore di 1 o 2°C rispetto alla T_m . Se i due primers hanno diverse temperature di melting, si considera quella più bassa.

3. Estensione (72°C) → fase di allungamento dei nuovi filamenti di DNA grazie all'enzima polimerasi, che copia il filamento stampo formando il nuovo filamento complementare.

Queste tre fasi si ripetono ciclicamente grazie all'uso del termociclatore, uno strumento che regola automaticamente le miscele di reazione alle temperature stabilite per un tempo specifico.

Per poter effettuare la PCR è necessario preparare una mix contenente i vari componenti fondamentali per far avvenire la reazione.

Componente	Concentrazione finale	Volume finale
Acqua milliQ sterile	/	41,35 µl
Buffer 10X	1X	5 µl
dNTP	200 µM	1µl
Primers	0,4 µM	0,2 µl
Dream Taq	1U	0,2 µl
DNA genomico	/	2 µl

Tabella 7 – Esempio di miscela di PCR usata in questo lavoro (volume finale 50 µl).

In questo studio la PCR è stata utilizzata per la ricerca di molteplici geni, utilizzando specifici primers riportati in Tabella 8.

Primers	Gene	Sequenza nucleotidica	Temperatura di melting (C°)	Dimensione (bp)
VIM-F	VIM	GATGGTGTGGTTCGCATA	56	390
VIM-R		CGAATGCGCAGCACCAG	56	
NDM-F	NDM	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	60	621
NDM-R		CGGAATGGCTCATCACGATC	62	
CTX-M_15-For	CTX-M_15	ACCGTCACGCTGTTGTTAGG	62	780
CTX-M_15-Rev		GCTTTCTGCCTTAGGTTGAG	60	
FIA-F	FIA	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	70	408
FIA-R		GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	72	
FIB-F	FIB	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	70	703
FIB-R		CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	68	
FrepB-F	FII	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	52	270
FrepB-R		GAAGATCAGTCACACCATCC	60	
MRxel1-F	MRxell	TTTAATCATGAGCAAACGCC	58	745
MRxel1-R		ACAACCCTGTCACCATAATC	58	
I1 PilN-F	PilN	GCACAGGAAGACTCAGCACA	62	956
I1 PilN-R		CCTGTAAAATCTCCGCTTGC	60	
I1 Col-F	Col	CTGTTTACAGATTAGACGAT	50	878
I1 Col-R		CAGCAGACACGGAATGAC	56	
MultiCaseCIT_F	CMY-42	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	62	538
MultiCaseCIT_R		ACGGACAGGGTTAGGATAGY	62	

Tabella 8 - Primer usati e relative caratteristiche (Poirel, 2011; Dallenne, 2010).

2.4.3 PCR multiplex

La PCR multiplex è una variante della PCR tradizionale che si basa sull'utilizzo di più coppie di primers diversi, ciascuna specifica per una certa sequenza genica. Questo permette di individuare la presenza di più geni contemporaneamente.

In questo studio la tecnica della PCR multiplex è stata utilizzata per la ricerca dei geni delle principali classi di β -lattamasi (*bla*SHV, *bla*TEM, *bla*OXA-1) (Tabella 9).

Primers	Gene	Sequenza	Temperatura di annealing (C°)	Dimensione (bp)
MultiTSO -T_for	TEM	CATTTCGGTGTCGCCCTTATTC	66	800
MultiTSO -T_rev		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	66	
MultiTSO -T_for	SHV	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	58	713
MultiTSO -T_rev		ATCCCGCAGATAAATCACCAC	62	
MultiTSO -T_for	OXA-1	GGCACCAGATTCAACTTTCAA G	64	564
MultiTSO -T_for		CATTTCGGTGTCGCCCTTATTC	66	

Tabella 9 – Primers usati e relative caratteristiche (Dallenne, 2010).

2.4.4 Elettroforesi su gel d'agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica di separazione che permette la migrazione, in un mezzo fluido e sotto l'impulso di un campo elettrico che le influenza, di particelle dotate di cariche come acidi nucleici e proteine.

In questo studio l'elettroforesi è stata utilizzata per separare i prodotti di amplificazione, cioè molecole di DNA che, essendo cariche negativamente, migrano dall'anodo al catodo, cioè dall'elettrodo negativo a quello positivo. La migrazione avviene su una matrice di gel d'agarosio, che funge da setaccio, con una velocità che è inversamente proporzionale alla loro dimensione.

È stato utilizzato principalmente un gel all'1% immerso in un tampone di corsa TAE 1X che favorisce la conduzione della corrente.

Preparazione gel d'agarosio (1%)

- Sciogliere accuratamente 1 g di agarosio in 100 μ l di TAE 1X in una bottiglia in vetro pirex con tappo a vite.
- Trasferire il preparato in microonde per qualche secondo per favorire lo scioglimento dell'agarosio.
- Aggiungere 300 μ l di GreenGel, molecola fluorescente intercalante del DNA grazie alla quale è possibile visualizzare le bande al transilluminatore.
- Versare e lasciare solidificare a temperatura ambiente il gel nell'apposita slitta elettroforetica dotata di pettinino per la formazione dei pozzetti.
- Una volta solidificato, il gel è pronto per essere immerso nella vaschetta elettroforetica e caricato con i campioni da analizzare.

Caricamento campioni e inizio corsa

In ogni pozzetto del gel vengono caricati 10 μ l di campione mescolati con 2 μ l di 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Questa soluzione contiene due coloranti, blu di bromofenolo e xilolo-cianolo FF, che aiutano a tracciare visivamente la migrazione del DNA durante l'elettroforesi. Inoltre, il glicerolo presente nella soluzione previene la dispersione del DNA durante il caricamento.

Nel primo pozzetto vengono caricati 5 μ l di marker 100 bp plus, un marker molecolare composto da frammenti di DNA di dimensioni note (da 100 a 3000 bp), utile per stimare la dimensione dei frammenti amplificati.

Dopo aver caricato tutti i campioni, si attiva il circuito elettroforetico applicando un voltaggio di 90 V. Dopo circa 30 minuti, la corsa elettroforetica viene interrotta e il gel viene osservato con un transilluminatore UV.

2.5 Tecniche di tipizzazione

Le tecniche di tipizzazione molecolare permettono di stabilire l'identità o la correlazione clonale di ceppi batterici.

In questo caso è stata utilizzata la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

2.5.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE, o elettroforesi su campo pulsato, è considerata il gold standard per la tipizzazione genotipica di batteri patogeni. Questa tecnica permette di separare grandi molecole di DNA applicando ad una matrice in gel un campo elettrico che cambia direzione periodicamente, seguendo un intervallo di tempo specifico chiamato *switch time*. Solitamente, lo *switch time* aumenta progressivamente a intervalli regolari, noti come *ramping*. L'angolo formato tra le direzioni dei due campi elettrici, denominato *field angle*, varia generalmente tra 110 e 120°.

Diversamente dall'elettroforesi standard, che può separare frammenti di DNA fino a 50 kb, la PFGE è in grado di separare frammenti fino a 10 Mb, permettendo l'analisi del DNA genomico.

I frammenti vengono ottenuti mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione in grado di tagliare i legami fosfodiesterici interni ad una sequenza specifica di DNA a doppio filamento.

In base ai frammenti ottenuti ed al confronto fra i profili genetici dei batteri, questi ultimi possono essere classificati come identici, strettamente correlati, probabilmente correlati o distinti.

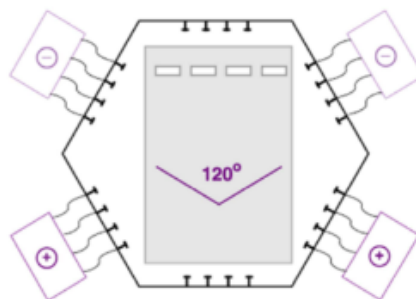


Figura 3 – Schema del funzionamento della PFGE.

Preparazione dei campioni

Il DNA genomico ad alto peso molecolare dei campioni da analizzare viene estratto *in situ*, previa immobilizzazione in un blocchetto di agarosio (PLUG). Questa procedura previene la frammentazione spontanea del DNA.

- Prelevare con un tampone sterile una quantità di ceppo da coltura overnight e stemperarlo in una provetta contenente 2 ml di Suspension Buffer (100 mM Tris + 100 mM EDTA pH 8.0 + acqua sterile ultrapura).
- Misurare l'assorbanza a 610 nm fino ad ottenere una densità ottica pari a 0,8.
- Trasferire 450 µl di sospensione batterica da ogni provetta nella relativa Eppendorf da 1,5 ml, aggiungendo poi 450 µl di Agarosio Low Melt al 1,6% [91,6% di Agar e 1% di SDS (sodio dodecilsolfato)].
- Prelevare da ogni Eppendorf 100 µl e inserirli nell'apposito stampino "plug mold" per ottenere le plug.

Lisi cellulare

- Trasferire le plug in 5 ml di Lysis Buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Sarcosyl in acqua sterile ultrapura) e 25 µl di Proteinasi K, per permettere la lisi cellulare e la fuoriuscita del DNA. Incubare a 54°C per 2 ore.
- Effettuare 2 lavaggi delle plug con 5 ml di acqua ultrapura e 4 lavaggi con TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 in acqua sterile ultrapura), entrambi preriscaldati a 55 °C.
- Al termine, risospendere le plug in 5 ml di TE fresco e conservarle in frigorifero a 4°C.

Digestione con XbaI

XbaI (T CTAGA) è un'endonucleasi di restrizione che taglia infrequentemente il DNA.

- Preparare tante Eppendorf quanti sono i ceppi da analizzare, e inserire all'intero di ognuna 20 µl di buffer di restrizione, 3 µl di enzima e 177 µl di acqua ultrapura, così da ottenere un volume finale di 200 µl.
- Prendere mezza plug con una spatola ed inserirla nella relativa Eppendorf.
- Incubare a 37°C overnight.
- Bloccare la digestione enzimatica con 500 µl di EDTA 0,1 M pH 8.0.

Digestione con S1

S1 è una nucleasi, prodotta da *Aspergillus oryzae*, che rimuove i frammenti di DNA a singolo filamento (ssDNA). L'enzima è utilizzabile per favorire la linearizzazione dei

plasmidi e consentire di valutarne la dimensione molecolare. È cinque volte più attivo sul DNA rispetto all'RNA.

- Preparare tante Eppendorf quanti sono i ceppi da analizzare, e inserire all'intero di ognuna 40 μl di buffer di restrizione, 1 μl di enzima e 159 μl di acqua ultrapura, così da ottenere un volume finale di 200 μl .
- Prendere mezza plug con una spatola ed inserirla nella relativa Eppendorf.
- Lasciare digerire per 30 minuti.
- Bloccare la digestione enzimatica con 500 μl di EDTA 0,1 M pH 8.0.

Caricamento pettine

- Prelevare la plug e posizionarla su un dente del pettine, utilizzando una 30 μl di Agarosio Low Melting all'1%.
- Sul primo dente del pettine inserire il marker Lambda PFGE Ladder (New England, Biolabs).

Preparazione del gel

- Preparare il gel di agarosio all'1%, aggiungendo 1,1 g di AGAR Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) a 110ml di buffer, sciogliere al microonde.
- Assemblare l'apposita camera di solidificazione e versare il gel.
- Attendere un'iniziale solidificazione per poi trasferire lo stampo in frigorifero.
- Rimuovere il gel del tutto induritosi dallo stampo e introdurlo nella PFGE.
- Riempire la camera elettroforetica con circa 2L di buffer TBE 0,5% fino a coprire il gel.

Corsa elettroforetica

Per eseguire l'elettroforesi viene impiegato il sistema CHEF Mapper XA (Bio-Rad), che permette una risoluzione che va da 100 bp a 10 Mb. Una pompa dedicata mantiene costante la temperatura del tampone di corsa TBE 0,5X (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.3, acqua sterile ultrapura) a 14°C.

I parametri di corsa variano a seconda dell'enzima di restrizione utilizzato.

Parametri	Xbal	S1
Field angle	120°	120°
Run time	22 ore	18 ore
Initial Switch Time	2,2 secondi	0,5 secondi
Final Switch Time	54,2 secondi	20 secondi
Ramping Factor	Lineare	Lineare
Gradient	6 V/cm	6 V/cm
Temperature	14°C	14°C

Tabella 10 – Parametri utilizzati nelle corse elettroforetiche.

Letture e interpretazione dei risultati

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

2.6 Sequenziamento

Il sequenziamento è un processo che permette di identificare l'ordine delle basi in un particolare tratto di DNA.

Lo strumento utilizzato per il sequenziamento dei ceppi è il *MinION Mk1B* della ditta *Oxford Nanopore Technologies*.

Il sequenziamento Nanopore utilizza nanopori inseriti in una membrana elettro-resistente, attraverso la quale scorre una corrente ionica. Quando una molecola di DNA o RNA passa attraverso il poro, induce una variazione specifica nel flusso di corrente, che dipende dalle basi presenti. Durante il passaggio della molecola attraverso il poro vengono effettuate diverse misurazioni, e il cambiamento di corrente viene poi tradotto in una sequenza genomica corrispondente da un software.

I campioni di DNA vengono estratti mediante il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* fornito dalla ditta Sigma-Aldrich. Prima di procedere al sequenziamento deve essere valutata la quantità e la qualità del DNA estratto.

Il DNA viene quantificato utilizzando il fluorimetro Qubit 4 (ThermoFisher Scientific), che offre una misurazione precisa della quantità di DNA, RNA e proteine. Si impiegano coloranti fluorescenti che si legano in modo specifico alle molecole di interesse. Successivamente, uno spettrofotometro viene impiegato per misurare l'assorbanza della luce a 260 nm per DNA e RNA, o a 280 nm per proteine.

È importante valutare anche la qualità del DNA estratto, assicurandosi che non risulti eccessivamente frammentato. Tale valutazione può essere effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il campione di buona qualità presenta una singola banda nitida, mentre la frammentazione è documentata da una diffusione lungo il percorso elettroforetico (*smear*).

3.RISULTATI



3.1 Determinazione della sensibilità agli antibiotici

I quattro ceppi di *Escherichia coli* sono stati sottoposti a test di sensibilità alle principali classi di antibiotici (β -lattamici, aminoglicosidi, chinoloni, tigeciclina, colistina, inibitori di folati, fosfomicina) e per evidenziare l'attività carbapenemasi mediante il test mCIM.

La **Tabella 11** riporta i risultati di mCIM e MIC ottenuti, interpretati in base ai valori di Breakpoint indicati nelle tabelle EUCAST (EUCAST v_12.0_Breakpoint Tables).

Ceppo	mCIM	MIC												
		IMI	MER	ETP	ATM	FEP	CIP	CN	AMK	TGC	FDC	COL	FOS	STX
NDM1	Pos	>16	>16	>16	>16	>8	16	16	1	0,25	0,5	0,25	0,5	>320
NDM2	Pos	16	8	>16	>16	>8	>16	>16	4	0,25	0,5	0,25	1	>320
NDM3	Pos	16	>16	>16	>16	>8	16	16	2	0,25	2	0,25	1	>320
NDM4	Pos	8	>16	>16	>16	>8	>16	>16	2	0,25	0,5	0,12	1	>320

Tabella 11 – Resistotipo dei ceppi in esame.

Legenda:  Sensibile  Resistente

I quattro ceppi condividono lo stesso resistotipo, mostrando resistenza a quasi tutti i β -lattamici testati, ed in particolare ai carbapenemi Ertapenem (ETP), Imipenem (IMI) e Meropenem (MER), e al monobattamico Aztreonam (ATM). Tale resistenza suggerisce la presenza di altri fattori di resistenza, dal momento che l'enzima NDM non idrolizza questo antibiotico. Sono invece tutti sensibili alla cefalosporina di quinta generazione Cediferocol (FDC).

Per quanto riguarda gli antibiotici non β -lattamici, tutti i ceppi sono resistenti alla Ciprofloxacina (CIP), agli antibiotici inibitori della sintesi di acido folico (SXT) e all'aminoglicoside Gentamicina (CN). Amikacina (AK), Colistina (COL), Tigeciclina (TGC) e Fosfomicina (FOS), invece, mantengono l'attività antimicrobica.

La resistenza ai carbapenemi è stata verificata mediante il test fenotipico mCIM, che evidenzia in tutti e quattro i ceppi un'attività carbapenemasi, ossia una produzione dell'enzima carbapenemasi.

3.2 Tipizzazione molecolare

I risultati di amplificazione hanno portato ad evidenziare nei ceppi in esame il seguente genotipo, riportato in **Tabella 12**.

I test sono stati eseguiti utilizzando primers specifici, descritti in Materiali e metodi, in grado di rilevare sia i geni di resistenza e di virulenza, sia la presenza di plasmidi specifici.

Ceppo	Geni di resistenza (β -lattamasi)	Geni di funzionalità plasmidica (gruppi Inc)	Geni di virulenza
NDM1	<i>bla</i> NDM; <i>bla</i> CMY; <i>bla</i> CTX-M-15	FIA FIB FII; Inc1a	-
NDM2	<i>bla</i> NDM; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1	FIA FIB FII; Inc1a	<i>cia</i> (colicina); <i>pil</i> (pilina)
NDM3	<i>bla</i> NDM; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1	FIA FIB FII; Inc1a	<i>cia</i> (colicina); <i>pil</i> (pilina)
NDM4	<i>bla</i> NDM; <i>bla</i> CTX-M-15; <i>bla</i> OXA-1	FIA FIB FII; Inc1a	<i>cia</i> (colicina); <i>pil</i> (pilina)

Tabella 12 – Risultati di amplificazione dei 4 ceppi di Escherichia coli.

Dai risultati ottenuti tramite la tecnica PCR, emerge una prima differenza tra i ceppi, in quanto il ceppo NDM1 ha un pattern di β -lattamasi differente rispetto agli altri tre. In particolare, NDM1 è positivo per i geni *bla*NDM, *bla*CMY e *bla*CTX-M-15, mentre i ceppi NDM2, NDM3 e NDM4 sono positivi per i geni *bla*NDM, *bla*CTX-M-15 e *bla*OXA-1.

Si presume che la resistenza dei ceppi all'ATM sia attribuibile al gene *bla*CTX-M-15, il quale codifica per una ESBL (β -lattamasi a spettro esteso).

Tuttavia, tutti e quattro i ceppi condividono lo stesso pattern plasmidico (FIA/FIB/FII; Inc1a). Inoltre, i tre ceppi provenienti dall'ospedale di Torrette (NDM2, NDM3 e

NDM4) possiedono il gene *cia*, responsabile della produzione di colicina, una batteriocina, e uno dei geni (*pil*) facente parte di un cluster legato alla produzione di pili di adesione.

3.3 Tipizzazione molecolare mediante PFGE

Per esaminare la relazione filogenetica tra i ceppi è stata effettuata un'analisi utilizzando XbaI-PFGE, i cui risultati sono illustrati nella **Figura 4**.

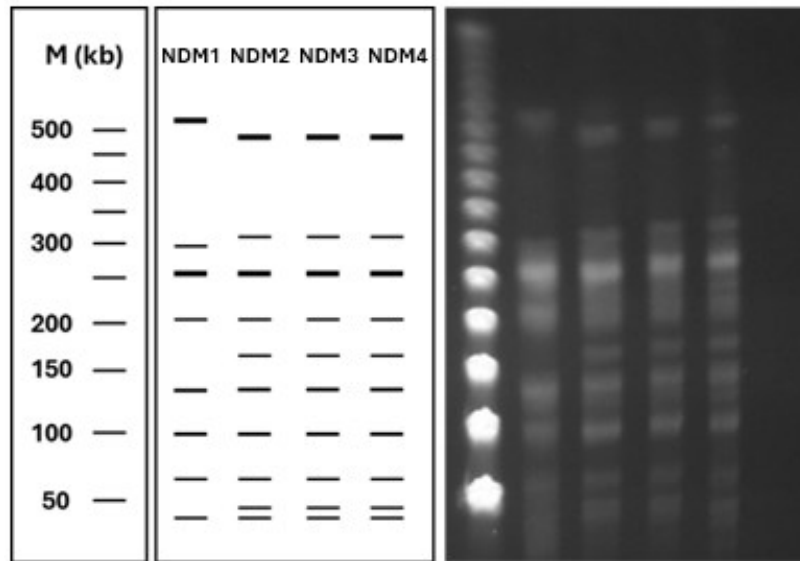


Figura 4 - Tipizzazione mediante XbaI-PFGE dei 4 ceppi di *E. coli* NDM-positivi.

Si può notare che il profilo di restrizione XbaI dei ceppi NDM2, NDM3 e NDM4 è identico (pulsotipo A), mentre NDM1 appare strettamente correlato (A1) secondo i criteri riportati in letteratura (**Tenover 1995**).

Inoltre, l'analisi S1-PFGE evidenzia tre plasmidi, approssimativamente di 130, 100 e 35 kb in NDM1 ed un unico plasmide negli altri tre campioni, con una dimensione molecolare di circa 170 kb.

3.4 Risultati ottenuti dal sequenziamento

I genomi dei quattro ceppi in esame sono stati studiati anche attraverso il sequenziamento Nanopore.

Dopo il sequenziamento e l'assemblaggio, sono state generate quattro sequenze in formato fasta (Ec_858511_NDM_unicycler.fasta, Ec_859655_NDM_unicycler.fasta, Ec_859720_NDM_unicycler.fasta, Ec_860001_NDM_unicycler.fasta).

Le analisi genomiche sono state condotte utilizzando il sito web Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/>).

I tools impiegati includono: *ResFinder* (per l'identificazione dei geni di resistenza agli antibiotici acquisiti), *VirulenceFinder* (per l'identificazione dei geni di virulenza acquisiti), *PlasmidFinder* (per individuare plasmidi in isolati batterici sequenziati totalmente o parzialmente) e MLST (tipizzazione multi-locus da genoma assemblato o da un insieme di letture).

I risultati ottenuti sono riportati nella **Tabella 13**.

Ceppo	ST	Plasmidi	Resistoma	
			Geni b-lattamasi	Altri geni di resistenza
NDM1	617	FIA/FIB/FII; Incl1; IncX4; Col (BS512)	NDM-5	erm(B); mph(A); aadA2; qacE; sul1; dfrA12; CTX-M-15; aac(3)-IId; dfrA14; CMY-42
NDM2	1284	FIA/FIB/FII; Incl1; ColRNAI	NDM-5	tet(B); aac(3)-IIa; dfrA17; qacE; mph(A); sul1; CTX-M-15; aadA5; catB3, OXA-1, aacA4
NDM3	1284	FIA/FIB/FII; Incl1; ColRNAI	NDM-5	tet(B); aac(3)-IIa; dfrA17; qacE; mph(A); sul1; CTX-M-15; aadA5; catB3, OXA-1, aacA4
NDM4	1284	FIA/FIB/FII; Incl1; ColRNAI	NDM-5	tet(B); aac(3)-IIa; dfrA17; qacE; mph(A); sul1; CTX-M-15; aadA5; catB3, OXA-1, aacA4

Tabella 13 - Plasmidi, geni di resistenza e Sequence Type dei ceppi in esame individuati in seguito al sequenziamento.

L'analisi MLST del Center for Genomic Epidemiology mostra che NDM1 appartiene al ST617, mentre i ceppi NDM2, NDM3 e NDM4 sono geneticamente identici, condividendo lo stesso *Sequence Type* (ST 1284).

Il ST 617 è strettamente correlato a ST 1284, poiché quest'ultimo è una variante di 617, risultata dalla variazione allelica di uno dei sette geni *housekeeping*. Complessivamente, i dati ottenuti dall'analisi XbaI-PFGE sono confermati dalla tipizzazione molecolare mediante *Multi Locus Sequence Type*.

La presenza dei plasmidi individuati tramite S1-PFGE è stata confermata anche dall'analisi con *PlasmidFinder*, che ha inoltre permesso di identificare ulteriori plasmidi non rilevati dall'elettroforesi. In particolare, tutti i ceppi presentano un piccolo plasmide Col, identico nei tre ceppi ST1284 e leggermente diverso nel ceppo NDM1, che inoltre possiede anche un plasmide IncX4.

Relativamente all'analisi del resistoma, tutti i geni identificati inizialmente mediante amplificazione PCR sono stati confermati, ma l'analisi di sequenziamento ha permesso di individuare numerosi altri geni di resistenza. Tutti gli isolati in esame presentano i geni *bla*NDM-5 e *bla*CTX-M-15, ma si differenziano per la presenza di altri geni di resistenza. Nello specifico, l'isolato NDM1 possiede il gene *bla*CMY-42, mentre i tre isolati ST1284 sono caratterizzati dalla presenza del gene *bla*OXA-1, assente invece nell'isolato NDM1.

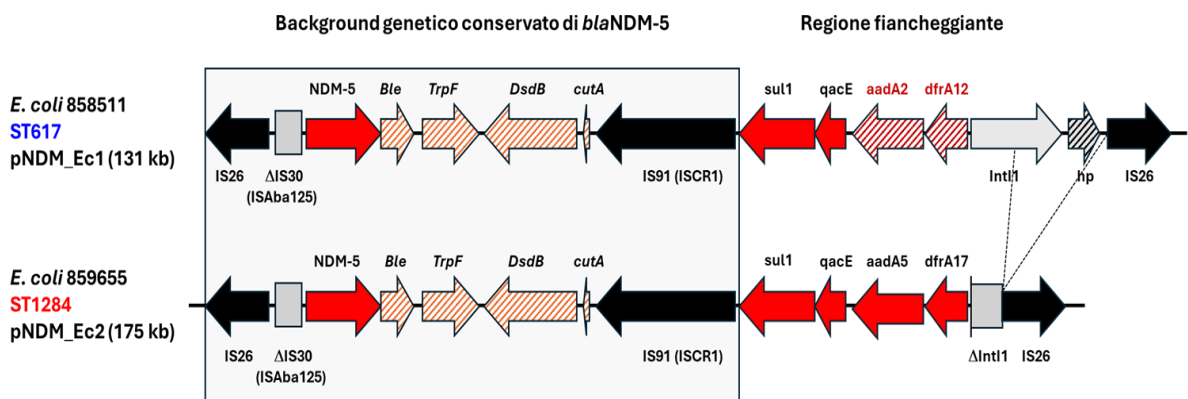


Figura 5 – Contesto genetico di *bla*NDM-5.

Le analisi di sequenza sono state impiegate per studiare il contesto genetico in cui è localizzato il gene *bla*NDM-5, al fine di approfondirne la caratterizzazione. È stata inoltre creata una mappa fisica, in cui il gene *bla*NDM-5 è indicato con una freccia rossa, così come gli altri geni di resistenza addizionali.

Il contesto genetico risulta perfettamente sovrapponibile a quello osservato in altri ceppi di *E. coli* isolati in Italia; le differenze riguardano principalmente le regioni adiacenti. Ad esempio, nel ceppo NDM1 (858511, ST617), rispetto agli altri tre ceppi, si riscontrano varianti alleliche diverse dei geni *aad* e *dfr* (*aadA2*, *dfrA12*, Figura 5); inoltre, i tre ceppi ST1284 hanno una delezione genica (Δ Int1) a monte della IS26.

In tutti i ceppi, il contesto genetico è veicolato dal plasmide coniugativo di tipo IncFII/FIA/FIB, benché le dimensioni molecolari siano diverse.

A completamento dello studio, sono state condotte prove di trasferimento genico orizzontale tramite coniugazione, utilizzando i ceppi NDM1 (858511, ST617) e NDM2 (859655, ST1284) come ceppi donatori in incroci intraspecifici usando ceppi riceventi di *E. coli*. Tuttavia, nonostante i numerosi tentativi, non si sono ottenuti risultati, suggerendo che il plasmide portante *bla*NDM-5 potrebbe non essere funzionale.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I quattro ceppi NDM-produttori isolati sono stati ampiamente caratterizzati per le loro proprietà fenotipiche e genetiche di resistenza. Questi sono stati tutti isolati all'inizio di agosto del 2023 da pazienti diversi di due distinti reparti. Il primo ceppo isolato in ordine cronologico (ST617) proviene da un campione clinico del Presidio Ospedaliero "G. Salesi", mentre gli altri tre geneticamente identici (ST1284) sono stati ottenuti da uno screening di tamponi rettali effettuato su pazienti diversi del reparto di Medicina generale degli Ospedali Riuniti Torrette di Ancona, aspetto che sembrava indicare una fonte comune di esposizione dall'ambiente. I ceppi NDM-produttori, infatti, possono essere isolati sia da campioni clinici umani, sia come microrganismi colonizzanti l'intestino di uomo ed animali, nonché essere presenti anche a livello di diverse matrici ambientali. In un recente report (**ECDC, 2023**) che segnalava l'incremento di ceppi di *E. coli* portanti la variante *bla*NDM-5, i dati disponibili riportavano che il 53,6% era acquisito in ospedale, mentre il 46,4% era acquisito in comunità.

Sulla base dei risultati di sensibilità, tutti i ceppi esaminati in questo studio erano classificati come *multidrug resistant organisms* (MDR), essendo resistenti ad almeno una molecola appartenente a tre o più classi di antibiotici (**Magiorakos, 2012**). In particolare, sono resistenti a tutti i β -lattamici studiati, eccetto la cefalosporina di ultima generazione cefiderocol (FDC), che mantiene l'attività microbica.

La multiresistenza è un aspetto comune alla maggior parte dei ceppi carbapenemasi produttori. Ciò è legato al fatto che i plasmidi portanti il gene *bla*NDM contengono spesso altri geni di resistenza e che possono essere presenti anche altri plasmidi di resistenza. Tale situazione è stata evidenziata nei ceppi in esame: in particolare, nei tre ceppi ST1284, il plasmide coniugativo IncFII/FIA/FIB, oltre al gene di carbapenemasi *bla*NDM-5, presenta altri due geni di beta-lattamasi, *bla*OXA-1 e *bla*CTX-M-15, quest'ultimo codificante per una ESBL responsabile della resistenza all'aztreonam e numerosi geni, riportati in Tabella 13, che conferiscono resistenza ad antibiotici quali gentamicina, sulfamidici e trimetoprim, verificata

sperimentalmente e ad altri antibiotici non studiati quali macrolidi e cloramfenicolo.

Tra le molteplici varianti del gene *bla*NDM, quella presente in tutti i ceppi analizzati è *bla*NDM-5, identificata per la prima volta nel Regno Unito nel 2011 in un ceppo di *Escherichia coli* ST648 multiresistente. Questo ceppo era stato isolato, tramite tampone perineale e faringeo per un controllo di screening di routine, da un paziente di 41 anni inizialmente che era stato ricoverato per encefalite da *Herpes simplex* e trattato con aciclovir. I tamponi erano stati seminati direttamente su CHROMagar KPC, un terreno selettivo per la crescita di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi e l'isolato è stato identificato come *Escherichia coli* tramite API 20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) e spettrometria di massa MALDI-TOF (Bruker UK Ltd., Coventry, Regno Unito) (**Hornsey, 2011**).

La variante *bla*NDM-5 si differenzia dalle precedenti a causa di sostituzioni amminoacidiche nelle posizioni 88, dove è presente una leucina al posto di una valina, e 154, dove è presente una leucina invece di una metionina. Queste sostituzioni aumentano l'attività carbapenemasi, per esempio le MIC ad Ertapenem di ceppi NDM-5-produttori sono da 4 a 8 volte più alte di quelle dimostrate da ceppi NDM-1-produttori (Wu, 2019). Tale variante è attualmente la più diffusa in *E. coli* e in crescita (**ECDC, 2023**).

Vista la sua elevata mobilità, il gene *bla*NDM può essere facilmente diffuso attraverso diverse modalità. Queste includono eventi di ricombinazione, acquisizione/perdita di materiale genetico, dovuti all'attività di sequenze di inserzione e trasposoni. Altro aspetto che amplifica la disseminazione è la grande varietà di plasmidi che possono ospitare l'elemento genetico che veicola *bla*NDM. Il contesto genetico risulta altamente conservato, caratterizzato da una sequenza di inserzione IS*Aba125* a monte di *bla*NDM e un gene di resistenza alla bleomicina, *ble*MBL, a valle. Altri geni, *trpF*, *dsbB* e *cutA1*, insieme alla sequenza di inserzione ISCR1, sono mappati a valle di *ble*MNBL. I contesti genetici delle varianti quali *bla*NDM-5 sono sovrapponibili. Le variazioni riguardano essenzialmente le sequenze fiancheggianti la regione conservata. Anche nei nostri ceppi è stata dimostrata la

medesima configurazione conservata (Figura 5, Risultati), con differenze alleliche dei geni *aad* e *dfr* tra il ceppo NDM-1 ST617 e i tre ceppi ST1284.

Come indicato in precedenza, in tutti i ceppi esaminati in questo studio, il gene *bla*NDM-5 è veicolato da plasmidi coniugativi di tipo FIA/FIB/FII. Tali plasmidi, ampiamente diffusi a livello globale e con una notevole prevalenza in Italia (Wu, 2019), sono compresi negli oltre 20 repliconi che portano il gene *bla*NDM; inoltre, proprio i plasmidi di gruppo IncFIA, IncFIB e IncFII sono quelli maggiormente associati alla trasmissione della variante *bla*NDM-5 in *E. coli*.

Pur con un numero di ceppi molto esiguo, la dettagliata caratterizzazione ha consentito di tracciare un quadro epidemiologico della circolazione di ceppi NDM-positivi nella nostra zona, confermando, da una parte, la maggiore diffusione della variante NDM-5 e, dall'altra, dell'acquisizione dell'elemento genetico da parte di plasmidi coniugativi FII/FIA/FIB.

Una costante e attenta sorveglianza è sicuramente di ausilio nel tracciare la dinamica della diffusione dei ceppi CRE (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*) in generale, ed in particolare dei ceppi produttori della nuova carbapenemasi NDM.

5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- **Bush K.**, 2018. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.
- **Dallenne C, Da Costa A, Decré D et al.** 2010. “Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae”. *J Antimicrob Chemother.* Mar; 65 (3): 490-495. DOI: 10.1093 / jac / dkp498.
- **ECDC surveillance report.** Increase in Escherichia coli isolates carrying blaNDM-5 in the European Union/European Economic Area, 2012–2022. May 2023
- **Eichenberger EM, Thaden JT.** Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug-resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics.* 2019;8(2). doi:10.3390/antibiotics8020037
- **EUCAST.** 2019. “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters”. Version 9.0 www.eucast.org.
- **Hornsey M., Phee L., Wareham W.W.,** A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo--Lactamase in a Multidrug-Resistant Escherichia coli ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom, 2011
- <https://microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-and-colony-characteristics/>
- <https://www.ars.toscana.it/2-articoli/4164-enterobatteri-ndm-new-delhi-cosa-sono-azioni-regione-toscana.html>
- <https://www.genomicepidemiology.org>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/terreni-di-coltura/>
- **Magiorakos AP, Srinivasan A., Carey RB et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

- **Nordmann P**, Medical and Molecular Microbiology Unit, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, rue Albert Gockel 3, CH-1700 Fribourg, Switzerland
- **Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB, Jr, Jenkins SG, Limbago BM, Das S.** 2017. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55:2321–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>.
- **Pittalis S., Ferraro F., Puro V.** NDM-1: il superbug? *Infez Med.* 2011 Dec;19(4):224-34.
- **Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P.** 2011. “Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes”. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 70 (1): 119-123. DOI: 10.1016 / j.diagmicrobio.2010.12.002.
- **Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL et al.** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- **Tavoschi L, Forni S, Porretta A, et al.,** per conto della Rete Toscana dei Laboratori di Microbiologia Clinica. Epidemia prolungata di Enterobacteriales produttori di metallo-beta-lattamasi di Nuova Delhi resistenti ai carbapenemi (NDM-CRE), Toscana, Italia, dal 2018 al 2019. *Sorveglianza europea.* Italiano: 2020;25(6):pii=2000085. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000085>
- **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.** Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing *J. Clin. Microbiology* Sept. 1995, p. 2233–2239 Vol. 33, No. 9.

- **Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z.** 2019. NDM metallo- β lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* 32:e00115-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>.
- **Yong D., Toleman M. A., Giske C.G.** Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India, 2009.

RINGRAZIAMENTI

Questo traguardo è il risultato di un percorso intenso, pieno di impegno e di momenti di crescita, che non avrei mai potuto raggiungere senza il supporto delle persone che mi sono state vicine.

Un sentito ringraziamento va alla mia relatrice, Prof.ssa Marina Mingoia, e alla mia correlatrice, Dott.ssa Gloria Magi, per la disponibilità e la pazienza con cui mi hanno seguita. Grazie per aver creduto nelle mie potenzialità e per avermi permesso di crescere sia a livello accademico che personale, offrendomi preziosi consigli e condividendo con me il vostro vasto sapere.

Un ringraziamento va anche a tutti i membri del laboratorio di Microbiologia, per aver contribuito in modo significativo alla mia formazione e alla buona riuscita del mio lavoro e per aver sempre chiarito ogni mio dubbio.

Grazie soprattutto alla mia famiglia, per aver sempre creduto in me e aver festeggiato ogni mio piccolo traguardo come se fosse il proprio, e ai miei amici, vicini e lontani, per essere stati la mia costante fonte di allegria e spensieratezza. Grazie per aver condiviso con me tutti i momenti belli e per avermi sostenuta in quelli più difficili di questo percorso. Vi voglio un bene immenso.

A tutti voi, il mio più sincero grazie.