



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata

**Identificazione mediante “replicon typing” di plasmidi di
resistenza in ceppi ambientali di *Escherichia coli***

**Replicon typing identification of resistance plasmids in
environmental strains of *Escherichia coli***

Tesi di Laurea Magistrale di:
Alessandra Federiconi

Relatore:
Prof.ssa Carla Vignaroli

Correlatore:
Dott.ssa Serena Simoni

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2019/2020

Indice

Capitolo 1.	INTRODUZIONE	pag. 4
	1.1 Caratteristiche generali di <i>Escherichia coli</i>	pag. 4
	1.2 <i>Escherichia coli</i> nell'ambiente e il suo utilizzo come indicatore di contaminazione fecale delle acque	pag. 7
	1.3 <i>Escherichia coli</i> come patogeno	pag. 11
	• <i>Escherichia coli</i> enteropatogeni (EPEC)	pag. 13
	• <i>Escherichia coli</i> enteroemorragici (EHEC)	pag. 13
	• <i>Escherichia coli</i> enterotossigeni (ETEC)	pag. 14
	• <i>Escherichia coli</i> enteroaggregativi (EAEC)	pag. 15
	• <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivi (EIEC)	pag. 16
	• <i>Escherichia coli</i> diffusamente aderenti (DAEC)	pag. 17
	• <i>Escherichia coli</i> uropatogeni (UPEC)	pag. 17
	• <i>Escherichia coli</i> associati a meningiti neonatali (NMEC)	pag. 18
	1.4 Filogruppi di <i>Escherichia coli</i> e cryptic clades	pag. 19
	1.5 Antibiotico-resistenza in <i>Escherichia coli</i>	pag. 23
	• Resistenza ai β -lattamici	pag. 27
	• Resistenza ai chinoloni e ai fluorochinoloni	pag. 28
	• Resistenza agli aminoglicosidi	pag. 28
	• Resistenza alle tetracicline	pag. 29
	• Resistenza ai sulfamidici e al trimethoprim	pag. 30

	• Resistenza alle polimixine	pag. 31
	1.6 Ruolo dei plasmidi come diffusori dell'antibiotico-resistenza	pag. 33
	• Plasmidi IncF	pag. 35
	• Plasmidi IncI	pag. 36
	• Plasmidi IncA/C	pag. 36
	• Plasmidi IncH	pag. 37
	• Plasmidi IncL/M	pag. 37
	• Plasmidi IncN	pag. 38
	1.7 Scopo della tesi	pag. 39
Capitolo 2.	MATERIALI E METODI	pag. 40
	2.1 Ceppi batterici utilizzati	pag. 40
	2.2 Estrazione del DNA totale	pag. 44
	2.3 Determinazione dei gruppi filogenetici di <i>E. coli</i> e dei cryptic clades	pag. 45
	2.4 Determinazione della sensibilità agli antibiotici: metodo della diffusione in agar da dischetto	pag. 50
	2.5 Saggi di PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) per la ricerca dei geni di resistenza	pag. 53
	2.6 PBRT (<i>PCR-based replicon typing</i>)	pag. 57
	2.7 Coniugazione	pag. 60
	2.8 <i>S1-Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (S1-PFGE)	pag. 61
	2.9 Southern blotting e ibridazione	pag. 63
	2.10 Analisi statistica	pag. 64
Capitolo 3.	RISULTATI	pag. 65

3.1	Determinazione del gruppo filogenetico di appartenenza dei ceppi di <i>Escherichia coli</i> utilizzati	pag. 65
3.2	Resistenza agli antibiotici degli isolati di <i>E. coli</i>	pag. 67
3.3	Ricerca dei geni di resistenza mediante saggi di PCR	pag. 69
3.4	Tipizzazione plasmidica degli isolati di <i>E. coli</i>	pag. 71
3.5	Profilo plasmidico dei ceppi di <i>E. coli</i> mediante S1-PFGE	pag. 75
3.6	Risultati degli esperimenti di coniugazione	pag. 76
3.7	Localizzazione plasmidica del gene <i>tet(A)</i>	pag. 77
Capitolo 4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 79
	BIBLIOGRAFIA	pag. 86

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche generali di Escherichia coli

Escherichia coli è la specie batterica più nota appartenente al genere *Escherichia*, che a sua volta fa parte dell'ampia ed eterogenea famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Fu documentato per la prima volta nel 1885 in Germania da Theodor Escherich che, durante gli studi sulla flora intestinale dei bambini, lo denominò *Bacterium coli comune*. Questo termine fu utilizzato fino al 1919 quando Castellani e Chalmers definirono il genere *Escherichia* e chiamarono la specie *Escherichia coli* (Bendinelli et al., 2006). L'analisi della sequenza genomica di questo microrganismo fu riportata per la prima volta nel 1997 e da allora più di 4800 genomi di *E. coli* sono stati sequenziati (Jang et al., 2017).

E. coli è un noto organismo modello ed in particolare il ceppo K-12 ed i suoi derivati sono stati fondamentali per l'avanzamento della genetica, della biologia molecolare, della fisiologia e della biochimica (Tenailon et al., 2010).

Si tratta di un batterio Gram-negativo di forma bastoncellare dalle estremità arrotondate, asporigeno e capace di movimento per la presenza di flagelli peritrichi. È un microrganismo aerobio-anaerobio facoltativo e, considerate le

sue semplici esigenze nutrizionali, è in grado di crescere in una notevole varietà di terreni di coltura tra cui l'agar Mac-Conkey, uno dei terreni selettivi più utilizzati (Antonelli et al., 2012); in condizioni ottimali di crescita, *E. coli* può crescere rapidamente, replicando in circa 20 minuti (Jang et al., 2017). Come gli altri enterobatteri, è capace di fermentare il glucosio, produrre la catalasi ed è ossidasi-negativo; quest'ultima è una caratteristica estremamente importante e utile per distinguere le specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* da molti altri bacilli Gram-negativi (Antonelli et al., 2012). *E. coli* è un microrganismo ubiquitario ma l'habitat primario è rappresentato dall'intestino dell'uomo e di molti animali, rappresentando uno dei più comuni commensali (Antonelli et al., 2012). Il commensalismo è una relazione benefica che si instaura tra microrganismo e ospite: in questo caso *E. coli* ricava dal proprio ospite sostanze nutritive e un ambiente stabile che gli fornisce protezione; allo stesso tempo questo microrganismo svolge diverse funzioni con effetti benefici per la salute dell'ospite, per esempio proteggendo dalla colonizzazione da parte di patogeni o producendo batteriocine, o contribuendo alla digestione di zuccheri complessi (Tenailon et al., 2010). Solitamente *E. coli* colonizza il tratto gastrointestinale dei neonati entro poche ore dalla nascita e la sua nicchia è rappresentata dallo strato mucoso che ricopre le cellule epiteliali del colon; è in grado di assicurarsi questa nicchia grazie alla sua

capacità di utilizzare il gluconato in maniera più efficiente rispetto ad altre specie residenti (Kaper et al., 2004, Tenaillon et al., 2010).

Oltre a svolgere un ruolo positivo per il suo ospite e ad essere un ottimo organismo modello, *Escherichia coli* è anche un noto patogeno molto versatile e spesso mortale (Kaper et al., 2004). Alcuni ceppi infatti, con l'acquisizione di caratteristiche di virulenza, si sono evoluti in patogeni in grado di dare infezioni sia comunitarie che nosocomiali, con interessamento di molti distretti corporei, quali l'intestino, le meningi e le vie urinarie, e sono diventati responsabili del decesso di più di 2 milioni di persone all'anno (Tenaillon et al., 2010).

Poiché fa parte della flora microbica intestinale e quindi viene rilasciato nell'ambiente attraverso la deposizione di materiale fecale, *E. coli* è anche ampiamente utilizzato come microrganismo indicatore di contaminazione fecale delle acque (Ishii & Sadowsky, 2008). È stato inoltre stimato che metà della popolazione di *E. coli* risiede proprio nell'acqua e nel sedimento che costituiscono degli habitat secondari (Tenaillon et al., 2010). Studi su questi habitat hanno mostrato che specifici ceppi possono sopravvivere per lunghi periodi di tempo in habitat extraintestinali e vi possono crescere qualora ci siano condizioni ambientali adeguate e disponibilità di nutrienti (Tenaillon et al., 2010, Jang et al., 2017).

1.2 Escherichia coli nell'ambiente e il suo utilizzo come indicatore di contaminazione fecale delle acque

L'habitat primario di *E. coli* è l'intestino degli animali a sangue caldo, compreso l'uomo (Ishii & Sadowsky, 2008, Jang et al., 2017), e può essere rilasciato nell'ambiente attraverso le deposizioni fecali e le acque reflue (Jang et al., 2017). Inizialmente si pensava che *E. coli* avesse una scarsa capacità di sopravvivenza nell'ambiente dove può essere sottoposto a diverse condizioni di stress, come basse e alte temperature, basso contenuto di materia organica e alta salinità. Nonostante questo, è stato visto che questo microrganismo può sopravvivere per un lungo periodo di tempo nell'ambiente e può replicarsi, adattandosi ad altri habitat probabilmente grazie alla sua versatilità nell'utilizzo di diverse risorse energetiche, alla sua capacità di crescere sia in condizioni di aerobiosi che di anaerobiosi e di crescere in corrispondenza di un'ampia gamma di temperature (7.5 – 49°C) (Ishii & Sadowsky, 2008).

La crescita e la sopravvivenza di *E. coli* nell'ambiente possono essere influenzate da numerosi fattori (Jang et al., 2017):

- la temperatura è probabilmente il fattore più importante: l'optimum di crescita per questo microrganismo è tra i 36 e i 40°C, range riscontrato nel tratto intestinale degli animali a sangue caldo; tuttavia, *E. coli* può crescere e sopravvivere a temperature variabili.

- La disponibilità di acqua e di nutrienti (carbonio, azoto, fosforo) sono fattori altrettanto importanti; infatti, nell'ambiente i nutrienti non sono prontamente disponibili se paragonati all'habitat intestinale.
- Anche il pH può influenzare la sopravvivenza e la crescita di *E. coli* e il livello di resistenza al pH varia a seconda dei ceppi, ad esempio alcuni ceppi di *E. coli* O157:H7 riescono a sopravvivere meglio a pH bassi piuttosto che alti.
- La radiazione solare è il fattore abiotico che più efficacemente causa la morte dei FIB (Fecal Indicator Bacteria) nell'ambiente acquatico. Le radiazioni, soprattutto quelle ad una bassa lunghezza d'onda (raggi UV), possono causare danno al DNA e l'ossidazione dei costituenti cellulari, ma questo può verificarsi in particolare a livello della superficie dell'acqua o del suolo. L'effetto della luce solare sulla sopravvivenza di *E. coli* è maggiore in acqua che nel suolo e nel sedimento e può variare in base al tempo di esposizione e alla torbidità dell'ambiente acquatico.
- La capacità di formare biofilm da parte di *E. coli* costituisce un fattore ben noto che contribuisce al mantenimento del microrganismo nell'ambiente. La produzione di biofilm protegge il microrganismo da condizioni ambientali ostili, come le radiazioni UV, l'essiccazione, la

predazione da parte di protozoi, e dalla presenza di antibiotici e disinfettanti.

Le infezioni correlate all'esposizione ad acqua ed alimenti contaminati da batteri fecali rappresentano un serio problema di salute pubblica con un notevole impatto economico (spese mediche, perdita di produttività, decremento del turismo, eccetera) non solo nei Paesi in via di sviluppo ma spesso anche nei Paesi sviluppati. Pertanto, diventa fondamentale il monitoraggio dei livelli di contaminazione fecale dei corpi idrici per la prevenzione delle epidemie (Ishii & Sadowsky, 2008).

In diverse tipologie di acque (potabili, sotterranee, ricreative) viene controllata la carica di batteri indicatori fecali (FIB) perché sono utili a segnalare l'eventuale presenza di patogeni nell'ambiente, spesso difficili da rilevare a causa del loro basso numero e dei loro specifici requisiti di crescita.

Storicamente i coliformi totali, i coliformi fecali, gli enterococchi ed *Escherichia coli* sono stati tutti utilizzati come indicatori di contaminazione fecale (Ishii & Sadowsky, 2008). Per determinare il migliore indicatore di contaminazione fecale, la United States Environmental Protection Agency (USEPA) ha correlato la presenza batterica alle malattie gastroenteriche associate al nuoto lungo un tratto balneabile della costa orientale degli Stati

Uniti. È stato riportato che gli enterococchi ed *E. coli* avevano la più alta correlazione con l'incidenza di malattia rispettivamente in aree marine e d'acqua dolce (Ishii & Sadowsky, 2008, Jang et al., 2017). *E. coli* è riconosciuto come un indicatore di contaminazione fecale anche dall'Australia, dall'Unione Europea e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Walk et al., 2009) e solitamente per rilevarlo nei corpi d'acqua vengono utilizzati metodi colturali, come la tecnica delle membrane filtranti, ma sono a disposizione anche dei kit commerciali di semplice utilizzo e convenienti, che riducono i tempi richiesti per le analisi (Jang et al., 2017).

Studi recenti hanno dimostrato che i sedimenti marini possono essere un importante reservoir di FIB e la risospensione del sedimento, che può essere causata da attività ricreative (fare il bagno) o eventi naturali (correnti, maree, onde), può portare ad un aumento della concentrazione dei FIB nella colonna d'acqua sovrastante, influenzando la qualità della stessa e determinando un potenziale rischio di infezione. Nonostante questo, le normative che riguardano il monitoraggio della qualità delle acque costiere ricreative non tengono conto, né in Europa né negli Stati Uniti, della valutazione dei FIB presenti a livello del sedimento, sebbene solitamente raggiungano concentrazioni più alte in questo habitat rispetto alla colonna d'acqua sovrastante (Vignaroli et al., 2013). Inoltre, il fatto che ceppi di *E. coli* si siano adattati a vivere in habitat diversi

da quello principale fa nascere il dubbio riguardo l'utilizzo di questo batterio come un indicatore di contaminazione fecale (Ishii & Sadowsky, 2008, Jang et al., 2017). Infatti, i ceppi ambientali e quelli di origine fecale sono indistinguibili basandosi sugli attuali metodi per testare la qualità dell'acqua e dunque la loro presenza potrebbe non essere correlata alla contaminazione fecale. C'è quindi la necessità di migliorare i metodi basati sui FIB per quantificare in maniera specifica soltanto *E. coli* di origine fecale; alternativamente, un monitoraggio delle acque indipendente dai FIB potrebbe essere un sistema migliore per prevedere i rischi per la salute umana (Jang et al., 2017).

1.3 Escherichia coli come patogeno

E. coli non è un microrganismo conosciuto esclusivamente per il suo essere un importante membro della flora microbica intestinale; infatti, nell'ambito di questa specie si sono evoluti diversi ceppi che causano malattie intestinali ed extraintestinali grazie alla produzione di fattori di virulenza che interferiscono con un'ampia gamma di processi cellulari. Questi fattori sono spesso codificati da elementi genetici mobili, che possono propagarsi in differenti ceppi e dare origine a nuove combinazioni geniche e nuovi genotipi (Kaper et al., 2004). Soltanto le combinazioni di maggiore successo hanno permesso ai batteri di

colonizzare nuove nicchie e hanno dato origine a specifici “patotipi” di *E. coli* capaci di causare malattie in individui sani (Kaper et al., 2004, Croxen & Finlay, 2010).

Le infezioni sostenute dai patotipi di *E. coli* possono dare tre tipologie di sindromi cliniche: manifestazioni enteriche/diarroiche, infezioni alle vie urinarie e sepsi/meningiti (Kaper et al., 2004). Nell’ambito dei patogeni intestinali si distinguono sei patotipi: *E. coli* enteropatogeni (EPEC), *E. coli* enteroemorragici (EHEC), *E. coli* enterotossigeni (ETEC), *E. coli* enteroaggregativi (EAEC), *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) ed *E. coli* diffusamente aderenti (DAEC). Tra le infezioni extraintestinali, invece, i patotipi più diffusi sono i ceppi uropatogeni (UPEC), responsabili di infezioni alle vie urinarie, e i ceppi associati a meningiti neonatali (NMEC) (Kaper et al., 2004, Croxen & Finlay, 2010).

Nella patogenesi di *E. coli* si possono individuare vari step: colonizzazione di una mucosa mediante fimbrie o pili, elusione delle difese dell’ospite, moltiplicazione e produzione del danno all’ospite (Kaper et al., 2004, Croxen & Finlay, 2010).

Di seguito sono riportate le caratteristiche principali di ciascuno dei patotipi sopra menzionati (Kaper et al., 2004, Croxen & Finlay, 2010).

***Escherichia coli* enteropatogeni (EPEC)**

I ceppi EPEC sono stati tra i primi patotipi di *E. coli* ad essere descritti negli anni '40-50. Nei Paesi industrializzati non si riscontrano più grandi focolai di diarrea infantile sostenuta dagli EPEC mentre nei Paesi in via di sviluppo rimangono un'importante causa di diarrea infantile potenzialmente letale.

La patogenicità di questi batteri dipende innanzitutto dall'iniziale attacco agli enterociti mediante pili formanti un fascio (*bundle-forming pili*) a codificazione plasmidica. All'adesione tenace del microorganismo alla superficie dell'enterocita fa seguito il rilascio di effettori nell'enterocita, tramite un sistema di secrezione di tipo III, entrambi codificati da un'isola di patogenicità chiamata LEE (*locus of enterocyte effacement*). Gli enterociti vanno così incontro a riarrangiamenti del citoscheletro e alle tipiche lesioni A/E (*attaching and effacing*) caratterizzate dalla distruzione dei microvilli.

***Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC)**

Riconosciuti per la prima volta come causa di malattia umana nel 1982, i ceppi enteroemorragici di *E. coli* rappresentano dei seri patogeni umani tipici dei Paesi industrializzati. Questi microrganismi sono particolarmente pericolosi perché è sufficiente una carica infettante bassissima per avviare il processo infettivo (si stimano meno di cento batteri).

Il principale serbatoio di questi batteri è costituito dal tratto intestinale dei bovini e le prime epidemie furono associate al consumo di hamburger poco cotti. Successivamente si è osservato che anche l'acqua o altri prodotti alimentari (salsicce, latte, lattuga) contaminati da questi batteri potevano essere associati allo sviluppo di infezioni da EHEC. O157:H7 è il sierotipo più frequente nel Nord America, nel Giappone e in parti dell'Europa ma esistono anche altri sierotipi che possono dare malattia in molti Paesi.

Molti ceppi EHEC contengono la stessa isola di patogenicità dei ceppi EPEC; tuttavia, i fattori di virulenza chiave dei ceppi enteroemorragici sono due potenti tossine (tossine Shiga-like o verocitotossine) a codificazione fagica, Stx1 e Stx2. Queste tossine passano in circolo e si legano ad uno specifico glicolipide particolarmente abbondante sulle cellule endoteliali a livello del colon e del rene ed è per questo motivo che i ceppi EHEC, oltre a causare diarrea, possono dare anche complicazioni quali colite emorragica e sindrome uremico-emolitica, manifestazioni cliniche potenzialmente fatali.

***Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC)**

I ceppi enterotossigeni di *E. coli* sono responsabili di una diarrea acquosa similcolerica ma che non è grave quanto quella provocata da *Vibrio cholerae*. Nei Paesi in via di sviluppo sono un'importante causa di diarrea infantile con

possibili conseguenze fatali nei bambini sotto i 5 anni; inoltre, i ceppi ETEC possono essere responsabili anche della cosiddetta “diarrea del viaggiatore”.

Gli ETEC colonizzano la superficie degli enterociti e rilasciano due tipi di tossine, la tossina LT (termo-labile) e la tossina ST (termo-stabile): la tossina LT è simile per struttura e funzione alla tossina colerica e provoca l'aumento della concentrazione intracellulare di cAMP; la tossina ST, invece, provoca l'aumento intracellulare del cGMP. L'effetto generato da entrambe è quello di procurare un'ipersecrezione di elettroliti e di acqua da parte dell'epitelio intestinale e quindi dare origine alla sindrome diarroica.

***Escherichia coli* enteroaggregativi (EAEC)**

I ceppi EAEC sono responsabili di diarrea spesso persistente nei bambini e negli adulti sia nei Paesi in via di sviluppo che nei Paesi industrializzati; in genere l'infezione è caratterizzata da diarrea acquosa che può essere accompagnata anche dalla perdita di muco e sangue.

I ceppi EAEC aderiscono alle cellule intestinali attraverso un meccanismo di tipo autoaggregativo, in cui i batteri si associano tra loro in una configurazione a “mattoni impilati”. Una volta aggregati e dopo che si è formato il biofilm sulla superficie degli enterociti, i batteri liberano enterotossine e citotossine, sebbene non tutti i ceppi EAEC siano in grado di produrre tossine. Le più comuni sono

la Pet, che provoca alterazioni dell'actina del citoscheletro e induce l'esfoliazione dell'epitelio, la EAST1 e la ShET1 (*Shigella enterotoxin 1*), che hanno un ruolo ancora poco chiaro nella patogenesi.

***Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC)**

I ceppi enteroinvasivi di *E. coli* sono strettamente correlati al genere *Shigella* e si distinguono dagli altri patotipi di *E. coli* perché si tratta di batteri intracellulari obbligati che non hanno né flagelli né fattori che mediano l'adesione. La virulenza di questo patotipo è dovuta ad un plasmide di circa 220 kb codificante per un sistema di secrezione di tipo III (T3SS) necessario per l'invasione, la sopravvivenza e l'apoptosi dei macrofagi. Una volta sfuggiti ai macrofagi, i batteri liberati nella sottomucosa invadono le cellule intestinali con l'aiuto di effettori rilasciati dal T3SS. Questi effettori provocano la formazione di code di actina che facilitano l'ulteriore diffusione nelle cellule contigue, oltre ad interferire con i processi cellulari.

I ceppi EIEC possono causare una colite infiammatoria invasiva e occasionalmente anche dissenteria ma nella maggior parte dei casi generano una diarrea acquosa che è indistinguibile da quella causata da altri patotipi di *E. coli*.

***Escherichia coli* diffusamente aderenti (DAEC)**

I ceppi diffusamente aderenti di *E. coli* sono causa di diarrea nei bambini con età compresa tra i 18 mesi e i 5 anni e danno infezioni ricorrenti del tratto urinario negli adulti. L'adesione alle cellule epiteliali dell'intestino e del tratto urinario è mediata dalla produzione di adesine fimbriali (Dr) e afimbriali (Afa) che riconoscono il recettore CD55, anche noto come fattore di accelerazione del decadimento del complemento (DAF). L'adesione induce la formazione di aggregati dei batteri adesi e una serie di reazioni a cascata che si manifestano con l'allungamento dei microvilli, come fossero delle dita, che avvolgono i batteri aderenti alle cellule intestinali. Inoltre, la secrezione della tossina Sat è stata associata alle lesioni che si osservano a livello delle *tight junctions* e all'aumento della permeabilità degli enterociti, che potrebbero contribuire alla sintomatologia diarroica dell'infezione da DAEC.

***Escherichia coli* uropatogeni (UPEC)**

E. coli è il più comune agente infettante del tratto urinario e può causare cistiti e pielonefriti: la prima è la manifestazione clinica più frequente e indica una localizzazione del batterio nella vescica (basse vie urinarie); le pielonefriti, invece, si instaurano quando il batterio riesce a raggiungere i reni (alte vie urinarie) e questo può avvenire quando le cistiti non vengono trattate.

Questi ceppi hanno la possibilità di muoversi dal tratto intestinale ed instaurare un'infezione alle vie urinarie: qui colonizzano l'area periuretrale, risalgono l'uretra e si localizzano nella vescica; oppure, anche se in minor misura, risalgono l'uretere fino a raggiungere i reni. Per poter colonizzare con successo il distretto urinario, i ceppi uropatogeni hanno sviluppato specifici meccanismi di tropismo d'organo, di adesione alla mucosa, di evasione del sistema immunitario dell'ospite per resistere alla loro eliminazione mediante il flusso dell'urina. Diversi fattori di virulenza contribuiscono alla patogenesi, tra cui pili (pili di tipo 1) e fimbrie (fimbrie P) di adesione, esotossine (per es. le tossine Sat e Vat), siderofori e una capsula polisaccaridica.

***Escherichia coli* associati a meningiti neonatali (NMEC)**

Questo patotipo di *E. coli* è la causa più comune di meningite neonatale sostenuta da batteri Gram-negativi, con un tasso di mortalità che va dal 15 al 40% e che lascia importanti danni neurologici in molti dei sopravvissuti. I ceppi NMEC sono comuni abitanti del tratto gastrointestinale che riescono ad entrare nel circolo sanguigno e a superare la barriera ematoencefalica, per poi passare al sistema nervoso centrale. Circa l'80% degli isolati NMEC possiede la capsula K1, che ha azione antifagocitaria e permette la diffusione del microrganismo. La capacità di evadere il sistema immunitario da parte di

questo patotipo dipende anche dalla produzione di una proteina della membrana esterna (ompA) che interagisce con il sistema del complemento, dalla capacità di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi e dalla variazione antigenica (acetilazione dell'antigene O). La ompA e i pili di tipo 1, che permettono l'adesione dei batteri alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni della barriera emato-encefalica insieme alla traslocazione della tossina CNF1 nelle cellule ospiti, contribuiscono alla formazione di edema, infiammazione e danno del sistema nervoso centrale.

1.4 Filogruppi di Escherichia coli e cryptic clades

Nel 1983 Whittam e i suoi colleghi hanno rivelato l'esistenza di sottostrutture genetiche nella specie *E. coli*, confermata anche da studi successivi (Clermont et al., 2013). Le prime analisi filogenetiche di ceppi di *E. coli* avevano, infatti, evidenziato quattro gruppi filogenetici principali, A, B1, B2, e D, a cui successivamente vennero aggiunti il filogrupo E, di cui O157:H7 è il membro maggiormente conosciuto, il filogrupo F, che comprende ceppi geneticamente vicini ai filogruppi B2 e D, ed il filogrupo C, costituito da ceppi strettamente correlati al filogrupo B1 (Tenailon et al., 2010, Clermont et al., 2011, Clermont et al., 2013, Gordon, 2013). I filogruppi menzionati finora

costituiscono i filogruppi di *E. coli sensu stricto* ai quali va aggiunto anche il clade I (Clermont et al., 2013).

Diversi studi hanno dimostrato che la distribuzione dei ceppi che appartengono ai filogruppi A, B1, B2 e D non è casuale: fanno parte del filograppo A molti ceppi commensali (Clermont et al., 2000) ed anche ceppi isolati da campioni di acqua dolce (Gordon, 2013); al filograppo B1 fanno parte dei ceppi frequentemente isolati in molti vertebrati (rane, rettili, uccelli e mammiferi carnivori) ed anche qui vi sono ceppi che vengono isolati da campioni di acqua dolce (Gordon, 2013); infine, i ceppi responsabili di infezioni extraintestinali appartengono solitamente ai filogruppi B2 e D mentre i patotipi responsabili delle infezioni intestinali si sono originati da tutti i filogruppi (Clermont et al., 2013, Gordon, 2013). Tra gli esseri umani che vivono nei Paesi industrializzati (Australia, Stati Uniti ed Europa) si trovano con minor frequenza i ceppi B1 rispetto a ceppi di altri filogruppi; invece, ceppi di filograppo A e B1 sono diffusi nei Paesi in via di sviluppo (Gordon, 2013). Anche la sopravvivenza dei ceppi di *Escherichia coli* nel suolo varia col filograppo di appartenenza: un fenotipo associato a ceppi capaci di sopravvivere a condizioni di stress è il morfotipo “rdar” (*red dry and rough*) che è maggiormente frequente nei ceppi B1 che nei ceppi appartenenti ad altri filogruppi (Gordon, 2013). Tale fenotipo, osservato inizialmente in *Salmonella* spp., sembra abbia un ruolo fondamentale

nella formazione di biofilm e nella resistenza a diversi agenti in condizioni ambientali sfavorevoli (White et al., 2006).

Nonostante sia chiaro che ceppi appartenenti a diversi filogruppi di *E. coli* siano diversi dal punto di vista fenotipico ed ecologico, si conosce ancora ben poco dei meccanismi che portano a queste differenze. Questa difficoltà è in gran parte legata alla grande diversità genetica in *E. coli*: infatti, un tipico genoma di questo microrganismo è costituito da circa 4700 geni di cui solo 2000 sono comuni a tutti i ceppi (Gordon, 2013).

Nel 2000 Clermont e i suoi colleghi (Clermont et al., 2000) hanno messo a punto un metodo che permette l'assegnazione di un ceppo di *E. coli* ad uno dei principali filogruppi (A, B1, B2, D). Questo metodo si basa su un saggio di PCR che consente di rilevare i geni *chuA* e *yjaA* e un frammento di DNA TspE4.C2. Negli anni successivi il rapido aumento dei dati genetici derivanti dall'applicazione della tecnica MLST (Multi-locus sequence typing) ha consentito una maggiore comprensione dell'estesa struttura genetica della specie *E. coli* (Clermont et al., 2013). Infatti, a questi quattro principali filogruppi ne sono stati riconosciuti altri, portando lo stesso Clermont (Clermont et al., 2013) a modificare il saggio di PCR per assegnare gli isolati anche ai nuovi filogruppi.

Dato che *Escherichia coli* è stato molto studiato per oltre un secolo, è stata sconcertante la scoperta che ceppi indistinguibili a livello fenotipico da *E. coli* fossero invece geneticamente divergenti. Analisi compiute su 22 geni del *core gene pool* hanno infatti mostrato che questi ceppi ricadono all'interno di cinque nuovi *clades* chiamati "cryptic": il clade I è strettamente correlato ad *E. coli* mentre i ceppi appartenenti al clade V sono quelli maggiormente divergenti; i clades III e IV sono *sister groups* e sono in una situazione intermedia tra *E. coli* e il clade V; infine, al clade II appartengono ceppi che non sono stati mai riportati in casi di infezione umana o animale, ma sono necessari ulteriori studi sui membri di questo clade per una loro corretta tassonomia (Walk et al., 2009, Clermont et al., 2011, Walk 2015).

Isolati di questi nuovi clades sono stati trovati negli Stati Uniti, in Porto Rico e in Australia ma si ritiene che ci sia una distribuzione mondiale dei clades (Walk et al., 2009). Per di più, i cryptic clades hanno una vasta gamma di habitat e sembrano essere molto rappresentati in habitat diversi dal tratto gastrointestinale (Walk et al., 2009). Infatti, ceppi appartenenti a qualsiasi cryptic clade di *Escherichia* hanno una frequenza del 2-3% nei campioni fecali umani e una frequenza ancor più bassa in siti del corpo extraintestinali; questo potrebbe spiegare il perché non siano stati trovati prima, dato che molte conoscenze su *E. coli* sono basate su isolati fecali e clinici (Clermont et al.,

2011). Al contrario, negli isolati provenienti da mammiferi (tranne l'uomo) possono raggiungere il 10% di frequenza e sono ancor più comuni negli uccelli (Clermont et al., 2011). Inoltre, Walk e i suoi colleghi (2009) hanno suggerito che i ceppi appartenenti ai cryptic clades potrebbero essere più diffusi in ambiente acquatico che nei mammiferi. Tutto questo indica che i ceppi appartenenti ai cryptic clades non rappresentano un significativo rischio per la salute dell'uomo ma potrebbero interferire con l'utilizzo di *E. coli* come indicatore di contaminazione fecale in ambiente acquatico (Clermont et al., 2011).

Nel 2011 Clermont e i suoi colleghi (Clermont et al., 2011) hanno sviluppato un saggio di PCR per compiere un'amplificazione allele-specifica di *aes* e *chuA*, al fine di determinare se un isolato con le caratteristiche fenotipiche di *E. coli* fosse un membro dei cryptic clades.

1.5 Antibiotico-resistenza in Escherichia coli

Per contrastare le infezioni batteriche sicuramente gli antibiotici sono stati una sorta di benedizione per l'umanità, permettendo di salvare milioni di persone. Verso la metà del ventesimo secolo c'era, infatti, una convinzione ottimistica che grazie a questi “farmaci miracolosi” potessero essere sconfitte definitivamente le malattie infettive. Ben presto, purtroppo, un uso enorme ed

irresponsabile degli antibiotici ha contribuito in modo significativo all'avvento dei ceppi batterici resistenti (Zaman et al., 2017). Secondo Martinez, Coque e Baquero (2015) un ceppo va definito resistente ad un determinato antibiotico se la sua concentrazione minima inibente (MIC) è più alta di quella del corrispondente ceppo parentale wild-type; di conseguenza, viene anche definito gene di resistenza quel gene che permette al microrganismo di sopravvivere a concentrazioni più alte di antibiotico e la sua assenza aumenta la sensibilità del microrganismo all'antibiotico (Bengtsson-Palme et al., 2018).

Le infezioni da batteri antibiotico-resistenti provocano la morte di centinaia di migliaia di persone ogni anno e questo ha spinto l'Organizzazione Mondiale della Sanità a considerare l'antibiotico-resistenza come una grave minaccia sanitaria globale (Bengtsson-Palme et al., 2018). Sono numerose le cause che favoriscono la diffusione dei batteri antibiotico-resistenti, ad esempio l'uso inappropriato di antibiotici da parte dell'uomo in terapia medica ma anche il loro massiccio impiego in agricoltura e negli allevamenti animali, le scarse norme igieniche e le inefficienti norme di prevenzione e di controllo delle infezioni nei contesti sanitari (Pormohammad et al., 2019).

La via principale attraverso cui l'uomo entra in contatto con batteri resistenti è rappresentata dal contatto interumano ma nel corso degli anni anche all'ambiente è stato riconosciuto un ruolo importante nell'origine e nella

diffusione delle resistenze; infatti, fognature, impianti di trattamento delle acque reflue, aerosol, polvere e cibo contaminato da batteri sono importanti vettori di trasmissione di batteri tra individui attraverso l'ambiente (Bengtsson-Palme et al., 2018).

È sempre più riconosciuto che non solo i geni di resistenza presenti nei patogeni clinici sono rilevanti nella diffusione dell'antibiotico-resistenza ma piuttosto tutti i batteri, sia patogeni che commensali o ambientali, costituiscono un serbatoio di geni di resistenza da cui i batteri patogeni possono acquisire la resistenza attraverso il meccanismo di trasferimento genetico orizzontale (Frieri et al., 2017). Il trasferimento genetico orizzontale ha dunque un ruolo centrale nella diffusione dei geni di resistenza e può essere indotto da fattori di stress, come ad esempio gli antibiotici (Bengtsson-Palme et al., 2018).

I batteri possono avere diversi meccanismi di resistenza: possono esser dotati di pompe di efflusso che portano fuori dalla cellula l'antibiotico; avere delle modificazioni a livello della parete o della membrana che riducono la permeabilità agli antibiotici; esprimere enzimi che rendono l'antibiotico inattivo oppure possono modificare il target dell'antibiotico (Bengtsson-Palme et al., 2018).

Un altro problema estremamente importante è lo sviluppo delle multiresistenze: può accadere che geni di resistenza verso diversi tipi di antibiotici possano

trovarsi sullo stesso elemento genetico mobile e quindi il batterio che lo possiede sarà capace di sviluppare resistenze verso differenti antibiotici. Per di più, l'uso globale di antibiotici va sempre aumentando e questo accelera ulteriormente il problema delle multiresistenze (Bengtsson-Palme et al., 2018). La multiresistenza porta a infezioni che sono difficili da trattare o che addirittura possono essere non trattabili con gli antibiotici convenzionali (Frieri et al., 2017), tanto che è stato stimato che ogni anno in Europa muoiono circa 25000 persone a causa di infezioni sostenute da batteri multiresistenti (Zaman et al., 2017).

Nell'ambito della resistenza agli antibiotici molto preoccupante è la rapida evoluzione della resistenza ai fluorochinoloni, alle cefalosporine e ai carbapenemi utilizzati contro le infezioni sostenute dalle *Enterobacteriaceae* (Mathers et al., 2015) ed in particolare nella specie *Escherichia coli* la multiresistenza, che può esser responsabile del fallimento terapeutico sia nella medicina umana che veterinaria, è ormai ampiamente diffusa (Poirel et al., 2018). *E. coli* è intrinsecamente sensibile alla maggior parte degli antibiotici clinicamente rilevanti ma questa specie batterica ha una grande capacità di accumulare geni di resistenza principalmente grazie a fenomeni di trasferimento genetico orizzontale (Poirel et al., 2018). Inoltre, ceppi di *E. coli*

multiresistenti, sono sempre più frequentemente isolati da animali e dall'ambiente che dall'uomo (Pormohammad et al., 2019).

Di seguito sono riportate le resistenze più problematiche in *E. coli* (Poirel et al., 2018).

Resistenza ai β -lattamici. I ceppi di *Escherichia coli* che producono le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) mostrano resistenza a molti β -lattamici, incluse penicilline, aminopenicilline e cefalosporine, sia di terza che di quarta generazione. Ceppi di *E. coli* produttori delle ESBL sono stati trovati in vari tipi di isolati, sottolineando l'ampia distribuzione di questi fattori di resistenza. TEM e SHV sono state le prime ESBL ad essere descritte ed erano predominanti fino al 2000; da allora sono emerse le CTX-M-ESBL, prevalentemente trovate in isolati commensali e patogeni sia nell'uomo che negli animali. In tutto il mondo il gene ESBL più comune in isolati umani di *E. coli* è *bla*_{CTX-M-15} che codifica per il rispettivo enzima (CTX-M-15), la cui disseminazione pandemica è favorita dal clone epidemico altamente virulento ST131.

Sebbene gli enzimi ESBL siano la causa più comune di resistenza verso le cefalosporine a spettro esteso in *E. coli*, anche gli enzimi di tipo AmpC conferiscono un alto livello di resistenza a questi agenti antimicrobici. Esistono

diversi enzimi AmpC ma quello con una maggiore prevalenza in tutto il mondo è quello di tipo CMY.

Le carbapenemasi sono state di rado trovate in *E. coli* di origine animale e questo è probabilmente legato ad una bassa o nulla pressione selettiva esercitata dai carbapenemi poiché questi antibiotici non vengono prescritti nella medicina veterinaria. Nonostante questo, negli ultimi anni batteri produttori di carbapenemasi, tra cui *E. coli*, sono stati isolati anche da animali. OXA, NDM e KPC sono le carbapenemasi più frequenti tra le *Enterobacteriaceae* e OXA-48 è l'enzima prevalente negli isolati di origine umana in tutta Europa.

Resistenza ai chinoloni e ai fluorochinoloni. Chinoloni e fluorochinoloni sono importanti agenti antimicrobici per il trattamento di diversi tipi di infezioni sia nell'uomo che negli animali. In *Escherichia coli* il target principale per entrambi è la DNA girasi e solitamente la resistenza a questi antibiotici è causata da mutazioni sul gene che codifica per questo enzima. Sono stati, inoltre, identificati anche altri meccanismi di resistenza negli isolati di *E. coli*, come le proteine Qnr-like, che proteggono il DNA dal legame con i chinoloni, un'acetiltransferasi, che modifica alcuni fluorochinoloni (come ciprofloxacina ed enrofloxacina), e la produzione di pompe di efflusso.

Resistenza agli aminoglicosidi. Gli aminoglicosidi sono farmaci di origine naturale che bloccano la traduzione. In *Escherichia coli* l'antibiotico-resistenza

a queste molecole può avvenire attraverso la produzione di metilasi, che esplicano la loro funzione sull'RNA 16S, oppure attraverso la produzione di enzimi che modificano gli aminoglicosidi in modo tale che non riescano a raggiungere o a legarsi al sito target. Tra le metilasi dell'RNA 16S, ArmA è quella più diffusa (trovata in diverse specie di batteri Gram-negativi oltre che in *E. coli*) in quanto associata al trasposone Tn1548, che media anche la resistenza ai sulfonamidi. L'inattivazione degli aminoglicosidi, mediante enzimi che modificano la molecola di antibiotico, dipende dall'azione di acetiltransferasi, nucleotidiltransferasi o fosfotransferasi: AAC(3)-II/IV e AAC(6)-Ib sono le più frequenti acetiltransferasi in *E. coli* di origine umana e animale; tra le nucleotidiltransferasi, ANT(2'') e ANT(3''), codificate rispettivamente dai geni *aadB* and *aadA* che sono spesso contenuti all'interno di integroni, sono le più comuni nei batteri Gram-negativi; infine, tra le fosfotransferasi, APH(6)-Ia e APH(6)-Id, codificate rispettivamente dai geni *strA* e *strB*, sono le più comuni nei ceppi di *E. coli* isolati ovunque.

Resistenza alle tetracicline. Le tetracicline sono ampiamente utilizzate in medicina veterinaria e di conseguenza la pressione selettiva causata dal loro impiego ha permesso lo sviluppo di resistenze in molti batteri, incluso *E. coli*. I principali meccanismi di resistenza alla tetraciclina presenti in *E. coli* di origine animale includono pompe di efflusso e proteine che proteggono i

ribosomi e, sempre in questo tipo di isolati, i geni di resistenza più diffusi codificanti pompe di efflusso sono *tet(A)* e *tet(B)*. Entrambi questi geni sono parte di piccoli trasposoni non coniugativi, Tn1721 [*tet(A)*] e Tn10 [*tet(B)*], a loro volta integrati in plasmidi coniugativi o meno.

Resistenza ai sulfamidici e al trimethoprim. I sulfamidici e il trimethoprim sono antibiotici che inibiscono differenti step della sintesi dell'acido folico e sono stati impiegati per decenni sia negli animali che nell'uomo. I sulfamidici inibiscono l'azione dell'enzima diidropteroato sintasi mentre il trimethoprim l'enzima diidrofolato reductasi. In ceppi animali di *E. coli* la resistenza ai sulfamidici e al trimethoprim è legata rispettivamente alla presenza dei geni *sul* (*sul1*, *sul2* e *sul3*) e dai geni *dfr*, che codificano per enzimi target modificati, insensibili a questi antibiotici. Il gene *sul1* è particolarmente diffuso perché fa parte della regione conservata degli integroni di classe 1, che sono molto frequenti in ceppi animali di *E. coli*. Il gene *sul2* è anch'esso ampiamente disseminato tra ceppi di *E. coli* isolati da diverse specie animali in varie parti del mondo; inoltre, questo gene è spesso associato ai geni di resistenza alla streptomicina *strA-strB*. Infine, il gene *sul3* è più frequente in ceppi suini di *E. coli* e spesso associato a geni di resistenza ai macrolidi come *mef(B)* o ad integroni di classe 1 insoliti.

La resistenza al trimethoprim è mediata da numerosi geni *dfr* trovati sia nelle *Enterobacteriaceae* che in molti altri batteri Gram-negativi. In base alle loro dimensioni e strutture, i geni *dfr* sono stati divisi in due gruppi principali, *dfrA* e *dfrB*. I geni *dfrA* codificano proteine da 152 a 189 aminoacidi mentre le proteine codificate *dfrB* hanno dimensioni minori (78 aminoacidi). La maggior parte dei geni *dfrA* (molto più frequenti) e *dfrB* trovati in *E. coli* di origine animale si trovano su cassette geniche inserite in integroni di classe 1 o 2.

Resistenza alle polimixine. La resistenza alle polimixine in *E. coli* è determinata da geni che codificano enzimi che modificano il lipopolisaccaride (LPS); un esempio è costituito dal gene *mcr-1* che codifica per una transferasi che porta alla modificazione del lipide A dell'LPS. Il gene *mcr-1* è stato identificato in tutto il mondo, sia in isolati umani che animali; per di più, alcuni studi hanno evidenziato che possono esserci *E. coli* *mcr-1*-positivi anche nell'ambiente e negli alimenti. Sono state riconosciute numerose varianti del gene *mcr* ma *mcr-1* è quella più diffusa in *E. coli* e in altre *Enterobacteriaceae*, spesso associata a plasmidi di dimensione variabile e appartenenti a vari gruppi di incompatibilità.

Come appena visto, *E. coli* può esser resistente a diverse classi di antibiotici e quindi diventa fondamentale monitorare l'andamento dell'antibiotico-resistenza. A livello europeo l'EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) è il principale sistema di sorveglianza per l'antibiotico-resistenza nei batteri responsabili di gravi infezioni; il suo scopo è quello di raccogliere, analizzare e fornire dati circa l'antibiotico-resistenza attraverso un network di sistemi di sorveglianza nazionali degli Stati Membri dell'Unione Europea, e anche dell'Islanda e della Norvegia. I Paesi forniscono i dati per tutte le otto specie batteriche che vengono monitorate (incluso *E. coli*) e vengono inseriti nell'EARS-Net i dati da isolati clinici invasivi (sangue e liquido cerebrospinale) (ECDC, 2019).

Per quanto riguarda la specie *Escherichia coli*, i dati riportati dall'EARS-Net per il 2018 indicano che oltre la metà degli isolati è resistente ad almeno uno dei gruppi antimicrobici che vengono monitorati (aminopenicilline, fluorochinoloni, cefalosporine di terza generazione, aminoglicosidi e carbapenemi). Nel 2018 la più alta percentuale di resistenza media pesata per la popolazione dei Paesi europei è stata riportata per le aminopenicilline (57.4%), seguita dai fluorochinoloni (25.3%), dalle cefalosporine di terza generazione (15.1%) e dagli aminoglicosidi (11.1%). La resistenza ai carbapenemi resta rara negli isolati di *E. coli* ma rimane comunque importante

continuare a monitorarla poiché è andata aumentando in diversi Paesi europei tra il 2010 e il 2018 (ECDC, 2019).

Le percentuali di resistenza maggiori solitamente sono riportate dai Paesi dell'Europa del sud e dell'est piuttosto che dagli Stati del nord, con l'Italia che rispetta questo trend negativo dei Paesi mediterranei (ECDC, 2019).

È chiaro che la resistenza agli antibiotici in *Escherichia coli* rimane un problema importante per la salute pubblica ed è necessario fare ulteriori sforzi per contenerla, adottando misure preventive non soltanto limitate alle strutture ospedaliere ma ampliate ai diversi contesti comunitari (ECDC, 2019).

1.6 Ruolo dei plasmidi come diffusori dell'antibiotico-resistenza

I batteri possiedono elementi genetici extracromosomiali capaci di replicazione autonoma noti come plasmidi. I plasmidi sono molecole di DNA a doppio filamento che non portano geni essenziali per la crescita delle cellule ospiti ed hanno meccanismi che controllano il loro numero di copie, garantendo un'eredità stabile durante la divisione cellulare. I geni portati dai plasmidi sono geni accessori che aumentano la *fitness* del microrganismo che li possiede, conferendo all'ospite fenotipi caratteristici come la produzione di fattori di virulenza o la resistenza agli antibiotici (Carattoli, 2009). I plasmidi, infatti,

sono considerati dei perfetti vettori per la diffusione della resistenza agli antibiotici in quanto hanno la capacità di acquisire nuovi geni attraverso elementi genetici mobili (trasposoni, sequenze d'inserzione, ecc.) (Rozwandowicz et al., 2018) e possono trasferirsi tra batteri di differenti generi e gruppi grazie al meccanismo della coniugazione (Carattoli, 2009).

Riconoscere e classificare i plasmidi è importante sia per analizzare la loro distribuzione in natura e la loro relazione con le cellule ospiti, che per scoprire le loro origini evolutive. Nel 1971 Hedges e Datta proposero un primo schema di classificazione dei plasmidi basato sulla loro stabilità durante la coniugazione, fenomeno noto come incompatibilità plasmidica. L'incompatibilità plasmidica viene definita come l'incapacità di due plasmidi che hanno controlli della replicazione comuni di essere propagati stabilmente nella stessa linea cellulare; di conseguenza, non possono coesistere nella stessa cellula plasmidi che appartengono allo stesso gruppo di incompatibilità (Carattoli, 2009). Tuttavia, è importante ricordare che esistono plasmidi che non rientrano in questa classificazione (Mathers et al., 2015).

I primi gruppi di incompatibilità (Inc) ad esser stati definiti furono IncI, IncN, IncF e IncP ma col tempo si è arrivati a riconoscere molti più gruppi di incompatibilità nelle *Enterobacteriaceae*, incluse sei varianti IncF e tre varianti IncI. Nel 1988, Couturier e i suoi colleghi proposero uno schema di tipizzazione

genetica dei plasmidi basato sul Southern blot ma questo approccio forniva una sottostima della diversità plasmidica a causa della sua bassa specificità (Carattoli, 2009). Dal 2005, invece, è disponibile un metodo noto come PBRT (*PCR-based replicon typing*) che ha come target i repliconi delle principali famiglie di plasmidi presenti nelle *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2009) ed è la tecnica più comunemente utilizzata per identificare i diversi tipi di plasmidi presenti in questa famiglia di batteri (Rozwandowicz et al., 2018). Esistono anche altri metodi che vengono impiegati per caratterizzare i plasmidi, ad esempio esistono schemi di tipizzazione plasmidica basati sulle differenze nei geni *mob* codificanti le relaxasi (enzimi essenziali sia nei plasmidi coniugativi che in quelli mobilizzabili), da cui deriva la classificazione MOB (Rozwandowicz et al., 2018).

Come già anticipato, nelle *Enterobacteriaceae* esiste una grande varietà di plasmidi identificati in isolati umani, animali ed ambientali e i gruppi più spesso rilevati sono IncF, IncI, IncA/C e IncH. Di seguito viene presentata una panoramica dei principali gruppi plasmidici in questa famiglia di batteri che sono correlati con l'antibiotico-resistenza (Rozwandowicz et al., 2018).

Plasmidi IncF. I plasmidi che appartengono al gruppo IncF sono plasmidi a basso numero di copie, coniugativi, con dimensioni tra i 45 e i 200kb e con lo spettro d'ospite limitato alla sola famiglia delle *Enterobacteriaceae*. A

differenza della maggior parte dei gruppi plasmidici, i plasmidi IncF possono portare diversi repliconi, tra cui FII, FIA e FIB. IncF è il gruppo plasmidico più frequentemente descritto da isolati umani e animali, specialmente nel continente asiatico, e si trova principalmente in *E. coli*. Questi plasmidi portano una gran varietà di geni di resistenza, tra cui quelli che codificano per le ESBL, per le carbapenemasi, per la resistenza agli aminoglicosidi e per quella ai chinoloni.

Plasmidi IncI. Di questo gruppo fanno parte plasmidi con un basso numero di copie e con limitato spettro d'ospite, coniugativi, che possono variare in dimensione da 50 fino a 250kb. All'interno del gruppo sono presenti diverse varianti: I1, I- γ e I2. In particolare, i plasmidi IncI2 possono migrare tra batteri di specie diverse. I plasmidi IncI sono molto diffusi (anche in campioni ambientali) ma vengono descritti prevalentemente in Europa da isolati animali di *E. coli* e *S. enterica* e i geni di resistenza trovati più di frequente sono quelli che codificano per le ESBL e per gli enzimi AmpC. Recentemente i plasmidi IncI2 sono stati descritti in associazione alla resistenza alla colistina mediata dal gene *mcr-1*.

Plasmidi IncA/C. I plasmidi IncA/C hanno un basso numero di copie, sono coniugativi e con un range di dimensioni tra i 40 e i 230kb. Questi plasmidi sono associati alla multiresistenza e sono diffusi in tutto il mondo. Sono stati

trovati sia da isolati umani che da isolati animali e sono coinvolti nella diffusione globale del gene *bla_{CMY-2}*. La variante IncA/C₂ è molto diffusa in diverse specie batteriche e può codificare ESBL (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e più raramente *bla_{CTX-M}*), AmpC (*bla_{CMY}*, *bla_{DHA}*), carbapenemasi (*bla_{OXA}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*) ed enzimi modificanti diverse classi di antibiotici, per esempio sulfonamidi (*sul1*, *sul2*), aminoglicosidi (*aphA1*, *aadA*, *aadB*, *strA*, *strB*, *aacC*), tetracicline *tet(A)*, cloramfenicolo (*floR*, *catA1*) e trimethoprim (*dfrA*).

Plasmidi IncH. È un gruppo di plasmidi a basso numero di copie con un ampio spettro d'ospite, incluse le *Enterobacteriaceae* e altri Gram-negativi, e le dimensioni di questi plasmidi possono variare tra i 75 e i 400kb. Sono stati identificati almeno tre gruppi (IncH1, IncH2 e IncH3) isolati principalmente in Europa in ceppi umani, animali e ambientali e molti fra questi sono stati associati alla multiresistenza perché, oltre ai geni per le ESBL, spesso portano geni che conferiscono la resistenza agli aminoglicosidi, ai sulfamidici e alle tetracicline. I plasmidi IncH2 sono stati recentemente associati con i geni *mcr-1* e *mcr-3* per la resistenza alla colistina, mentre plasmidi IncH3 sono stati trovati portare il gene *bla_{NDM}* per la resistenza ai carbapenemi.

Plasmidi IncL/M. Sono un gruppo di plasmidi con un ampio spettro d'ospite e un basso numero di copie, con dimensioni mediamente ridotte rispetto ai precedenti gruppi plasmidici (50-80 kb). I plasmidi di questo gruppo possono

portare geni che conferiscono la resistenza ai β -lattamici, ai carbapenemi e agli aminoglicosidi. In particolare, un plasmide IncL di 60kb con il gene *bla*_{OXA-48} è spesso isolato da ceppi ospedalieri di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi.

Plasmidi IncN. I plasmidi IncN sono plasmidi con un ampio spettro d'ospite e che hanno dimensioni comparabili ai plasmidi del gruppo IncL/M (30-70 kb). Questi plasmidi portano una grande varietà di determinanti di resistenza verso i β -lattamici a spettro esteso, sulfamidici, chinoloni, aminoglicosidi e tetracicline. I plasmidi IncN spesso portano il trasposone Tn1721 che codifica per la resistenza alla tetraciclina (grazie ai geni *tetA* e *tetR*) e il trasposone Tn5393 che porta i geni *strA* e *strB*.

Come accennato in precedenza, esistono molti altri importanti gruppi di incompatibilità nelle *Enterobacteriaceae*, come IncK e IncX, e anche gruppi di plasmidi (come IncR e IncW) che vengono rilevati più di rado ma che comunque sono coinvolti nella continua diffusione dei geni di resistenza (Rozwandowicz et al., 2018).

1.7 Scopo della tesi

Mentre in ambito clinico è stata dimostrata l'associazione tra cloni ad alto rischio e plasmidi che portano la resistenza agli antibiotici (Mathers et al., 2015), gli isolati ambientali di *Escherichia coli* non sono stati studiati approfonditamente circa la diversità e la trasferibilità dei plasmidi che portano resistenze agli antibiotici, nonostante la valutazione del loro profilo plasmidico potrebbe aiutare nell'identificazione di ceppi pericolosi e la loro origine. Inoltre, la ricorrenza di alcuni plasmidi potrebbe indicare il loro ruolo nella sopravvivenza del ceppo in specifici habitat così come la loro importanza nel favorire la diffusione dell'antibiotico-resistenza.

In questo lavoro di tesi, pertanto, ceppi di *E. coli* isolati da campioni di sedimento marino e da vongole sono stati analizzati per il loro contenuto plasmidico, per determinare la distribuzione e la prevalenza dei principali repliconi di *E. coli*, e per valutare la trasferibilità di alcuni plasmidi associati all'antibiotico-resistenza. I risultati di questo lavoro sono stati recentemente pubblicati (Citterio & Andreoni et al., 2020).

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici utilizzati

In questo lavoro di tesi sono stati esaminati 103 ceppi di *Escherichia coli*, di cui 53 isolati da vongole (*Chamelea gallina*), forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (sede di Ancona, Italia), e 50 dal sedimento marino. I 53 ceppi provenienti dalle vongole sono stati scelti da una collezione di 141 isolati, ottenuti da esemplari raccolti nel mar Adriatico centrale lungo la costa marchigiana (Italia); in particolare, sono stati selezionati i ceppi ottenuti da campioni provenienti dalle aree più prossime ai siti di campionamento del sedimento. Questi ceppi erano già stati caratterizzati in lavori precedenti per il filogrupo di appartenenza e per la sensibilità agli antibiotici (Vignaroli et al., 2016). I 50 ceppi provenienti dal sedimento, invece, sono stati isolati da campioni raccolti da tre siti lungo la costa, a diversa profondità (4-15 m), in corrispondenza dei comuni di Senigallia (SEN), Portonovo (PN) e Falconara Marittima (API).

Seguendo un protocollo descritto in lavori precedenti (Luna et al., 2010, Vignaroli et al., 2013), aliquote di ciascun campione (5g) sono state sospese in

20 ml di acqua di mare sterile, agitate vigorosamente (vortex) e sonicate (3 volte, un minuto per ciclo) per consentire il distacco dei batteri dal sedimento. In seguito, le sospensioni sono state filtrate per mezzo del metodo delle membrane filtranti, i filtri posti sul terreno selettivo mFC agar (BBL, Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, Stati Uniti) e le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione, le colonie sospette sono state ulteriormente seminate su terreni selettivi (MacConkey agar) e identificate a livello di specie mediante PCR specie-specifica (amplificazione del gene *uidA* di *E. coli*). Un totale di 50 ceppi di *E. coli* è stato identificato.

Nella **tabella 1** vengono mostrati i ceppi che sono stati presi in esame in questo studio.

Tabella 1. Elenco dei ceppi di *Escherichia coli* analizzati.

	Ceppo da vongola	N° campione	Sito di campionamento	Area
1	ISZ 6	15044/1A	ZONA 2	Cesano
2	ISZ 12	15044/2	ZONA 2	Cesano
3	ISZ 20	15044/3A	ZONA 3	Cesano
4	ISZ 33	15038/3	ZONA 4	Esino API
5	ISZ 35	15038/3	ZONA 4	Esino API
6	ISZ 40	15038/5	ZONA 5	Falconara
7	ISZ 45	15038/6	ZONA 5	Falconara
8	ISZ 48	15038/6	ZONA 5	Falconara
9	ISZ 49	15038/6	ZONA 5	Falconara
10	ISZ 54	15038/6	ZONA 5	Falconara
11	ISZ 57	15038/7	ZONA 13	Palombina
12	ISZ 61	15038/9	ZONA 6	Falconara
13	ISZ 63	15038/9	ZONA 6	Falconara

14	ISZ 64	15038/9	ZONA 6	Falconara
15	ISZ 67	15038/10	ZONA 7	Falconara
16	ISZ 115	25018/1C	ZONA 1	Ancona
17	ISZ 116	25018/1D	ZONA 1	Ancona
18	ISZ 139	35965/9C	ZONA 6	Falconara
19	ISZ 140	35965/9D	ZONA 6	Falconara
20	ISZ 151	35964/C	ZONA 1	Ancona
21	ISZ 152	35964/D	ZONA 1	Ancona
22	ISZ 166	36156/1B	ZONA 22	Ancona Nord
23	ISZ 167	36156/1C	ZONA 22	Ancona Nord
24	ISZ 168	36156/1D	ZONA 22	Ancona Nord
25	ISZ 189	35243/3A	ZONA 3	Cesano
26	ISZ 190	35243/3B	ZONA 3	Cesano
27	ISZ 191	35243/3C	ZONA 3	Cesano
28	ISZ 192	35243/3D	ZONA 3	Cesano
29	ISZ 201	41250/1	ZONA 12	Marzocca
30	ISZ 206	41250/2	ZONA 12	Marzocca
31	ISZ 210	41250/3	ZONA 4	Esino API
32	ISZ 211	41250/3	ZONA 4	Esino API
33	ISZ 214	41250/4	ZONA 4	Esino API
34	ISZ 219	43523/1	ZONA 2	Cesano
35	ISZ 220	43523/2	ZONA 2	Cesano
36	ISZ 221	43523/2	ZONA 2	Cesano
37	ISZ 254	52184/1C	ZONA 12	Marzocca
38	ISZ 255	52184/1D	ZONA 12	Marzocca
39	ISZ 256	52184/2A	ZONA 12	Marzocca
40	ISZ 257	52184/2B	ZONA 12	Marzocca
41	ISZ 258	52184/2C	ZONA 12	Marzocca
42	ISZ 259	52184/2D	ZONA 12	Marzocca
43	ISZ 260	52184/3A	ZONA 4	Esino API
44	ISZ 269	461/1A	ZONA 12	Marzocca
45	ISZ 271	461/4A	ZONA 4	Esino API
46	ISZ 272	461/4B	ZONA 4	Esino API
47	ISZ 274	6767/1A	ZONA 12	Marzocca
48	ISZ 275	6767/1B	ZONA 12	Marzocca
49	ISZ 276	6767/1C	ZONA 12	Marzocca
50	ISZ 280	6767/2C	ZONA 12	Marzocca
51	ISZ 281	6767/3A	ZONA 4	Esino API
52	ISZ 314	32120/3	ZONA 4	Esino API

53	ISZ 325	461/10	ZONA 6	Falconara
	Ceppo da sedimento	N° campione	Sito di campionamento	Area
1	18API-14	2012/10	API	Falconara Marittima
2	18API-15	2012/10	API	Falconara Marittima
3	18API-16	2012/10	API	Falconara Marittima
4	API(9)-1	2012/9	API	Falconara Marittima
5	API8	2013/2	API	Falconara Marittima
6	API25	2012/5	API	Falconara Marittima
7	11PN23	2013/1	PN	Portonovo
8	PN1	2013/2	PN	Portonovo
9	PN3	2013/2	PN	Portonovo
10	PN5	2013/2	PN	Portonovo
11	PN6	2013/2	PN	Portonovo
12	PN8	2013/2	PN	Portonovo
13	PN9	2013/2	PN	Portonovo
14	PN10	2013/2	PN	Portonovo
15	PN12	2013/2	PN	Portonovo
16	PN13	2013/2	PN	Portonovo
17	PN14	2013/2	PN	Portonovo
18	PN15	2013/2	PN	Portonovo
19	PN16	2013/2	PN	Portonovo
20	PN20	2013/2	PN	Portonovo
21	PN22	2013/2	PN	Portonovo
22	PN23	2013/2	PN	Portonovo
23	PN24	2013/2	PN	Portonovo
24	PN25	2013/2	PN	Portonovo
25	PN26	2013/2	PN	Portonovo
26	PN29	2013/2	PN	Portonovo
27	PN30	2013/2	PN	Portonovo
28	PN31	2013/2	PN	Portonovo
29	PN32	2013/2	PN	Portonovo
30	PN33	2013/2	PN	Portonovo
31	PN34	2013/2	PN	Portonovo
32	PN35	2013/2	PN	Portonovo
33	PN36	2013/2	PN	Portonovo
34	PN37	2013/2	PN	Portonovo
35	PN40	2013/2	PN	Portonovo
36	PN41	2013/2	PN	Portonovo
37	PN42	2013/2	PN	Portonovo
38	PN43	2013/2	PN	Portonovo
39	PN44	2013/2	PN	Portonovo
40	PN45	2013/2	PN	Portonovo
41	PN46	2013/2	PN	Portonovo

42	PN47	2013/2	PN	Portonovo
43	PN48	2013/2	PN	Portonovo
44	PN50	2013/2	PN	Portonovo
45	PN54	2013/2	PN	Portonovo
46	PN55	2013/2	PN	Portonovo
47	PN56	2013/2	PN	Portonovo
48	SEN3	2013/2SE	SEN	Senigallia
49	SEN4	2013/2SE	SEN	Senigallia
50	SEN7	2013/2SE	SEN	Senigallia

2.2 Estrazione del DNA totale

Per l'estrazione del DNA totale, è stato seguito un metodo messo a punto da Hynes e collaboratori (Hynes et al., 1992). Si procede con l'allestimento di una coltura overnight del ceppo in 3ml di brodo Brain Heart Infusion (Oxoid, Basingstoke, Regno Unito); 1ml della brodocoltura viene centrifugato per 7 minuti a 16.000 x g a temperatura ambiente e al termine si elimina completamente il sopranatante; il pellet, invece, viene risospeso in 1ml di tampone STE (Tris 10mM pH 8; NaCl 100mM; EDTA 1mM pH 8) addizionato al 20% di saccarosio e liozima (2.5mg/ml) e successivamente incubato per 30 minuti ad una temperatura di 37°C. A seguire si effettua una nuova centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g a temperatura ambiente; il sopranatante viene eliminato e il pellet risospeso in 1ml di tampone di lisi (KCl 50mM; Tris 10mM pH 8.3; gelatina 0.1mg/ml; Nonidet P-40 0.45%; Tween 20 0.45%; Proteinasi K 5µg/ml) e incubato per 30 minuti a 60°C. Infine, l'estratto

viene incubato a 95°C per 10 minuti per inattivare le proteasi e denaturare il DNA. Gli estratti di DNA totale ottenuti vengono messi immediatamente in ghiaccio e poi conservati ad una temperatura di -20°C.

2.3 Determinazione dei gruppi filogenetici di E. coli e dei cryptic clades

Ciascun isolato di *E. coli* è stato assegnato ad un gruppo filogenetico o ad un cryptic clade sfruttando i metodi di PCR realizzati da Clermont e collaboratori (Clermont et al., 2011, 2013).

Per determinare il gruppo filogenetico degli isolati di *E. coli* è stata eseguita una PCR multipla (quadruplex PCR) per amplificare i geni *arpA*, *chuA*, *yjaA* e il frammento di DNA TspE4.C2. Inoltre, per identificare i ceppi appartenenti ai filogruppi C ed E, sono state fatte ulteriori PCR, utilizzando primer specifici, in cui come controllo interno è stata utilizzata la coppia di primer *trpBA.f/trpBA.r* (**tabella 2**).

Tabella 2. Sequenza dei primer utilizzati per l'assegnazione dei gruppi filogenetici e dimensioni dei prodotti di PCR (Clermont et al., 2013).

	Gene target	Primer	Sequenza nucleotidica	Dimensione amplificati (bp)
Quadruplex PCR	<i>chuA</i>	chuA.1b	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288
		chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3'	211
		yjaA.2b	5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	
	TspE4.C2	TspE4C2.1b	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152
		TspE4C2.2b	5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	
	<i>arpA</i>	AceK.f	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400
		ArpA1.r	5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	
PCR gruppo E	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'	301
		ArpAgpE.r	5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	
PCR gruppo C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1	5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'	219
		trpAgpC.2	5'-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3'	
Controllo interno	<i>trpA</i>	trpBA.f	5'-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3'	489
		trpBA.r	5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	

Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume di 50µl secondo le seguenti condizioni di reazione:

- 4 minuti di denaturazione a 94°C;

- 30 cicli composti da: 15 secondi a 94°C, 30 secondi per la fase di annealing a 57°C (quadruplex PCR e PCR gruppo E) o a 62°C (PCR gruppo C) e 45 secondi di allungamento a 72°C;
- 5 minuti di step finale di estensione a 72°C.

Terminata la reazione, gli amplificati sono stati caricati su gel d'agarosio all'1,5% in TAE (Tris-acetato 40 Mm; EDTA 1 mM, pH 8.0) 1X e come peso molecolare standard è stato utilizzato il GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). La corsa elettroforetica è stata condotta a 60V.

Sulla base dei risultati ottenuti dalla quadruplex PCR, un isolato o viene immediatamente assegnato ad un filogruppo o necessita di ulteriori prove, come descritto nella **tabella 3**.

Tabella 3. Interpretazione dei risultati della quadruplex PCR e step necessari per assegnare un isolato di “*E. coli*” al filogruppo (Clermont et al., 2013).

Risultati quadruplex PCR				Filogruppo	Step successivo
<i>arpA</i> (400bp)	<i>chuA</i> (288bp)	<i>yjaA</i> (211bp)	TspE4.C2 (152bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	

-	+	+	+	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Potrebbe essere confermato testando la presenza del gene <i>ibeA</i>
+	-	+	-	A o C	Testare usando i primers specifici per gruppo C: se C+ allora C, altrimenti A
+	+	-	-	D o E	Testare usando i primers specifici per gruppo E: se E+ allora E, altrimenti D
+	+	-	+	D o E	Testare usando i primers specifici per gruppo E: se E+ allora E, altrimenti D
+	+	+	-	E o clade I	Testare usando i primers specifici per gruppo E: se E- allora clade I, confermare usando primers per clade criptici
-	-	+	-	Clade I o II	Confermare usando primers per clade criptici
-	476	-	-	Clade III, IV o V	Confermare usando primers per clade criptici
-	-	-	+	Sconosciuto	Eseguire MLST
-	-	+	+	Sconosciuto	Eseguire MLST
+	-	+	+	Sconosciuto	Eseguire MLST
+	+	+	+	Sconosciuto	Eseguire MLST
-	-	-	-	Sconosciuto	Confermare l'identificazione per <i>Escherichia</i> usando <i>uidA</i> o <i>gadA/B</i> : se positiva testare usando primers per clade criptici e/o eseguire MLST

Per la determinazione dei cryptic clades, invece, è stata eseguita una PCR allele-specifica dei geni *chuA* e *aes*. Poiché son presenti dei polimorfismi a singolo nucleotide specifici dei vari clade, è possibile compiere una reazione di amplificazione generando prodotti di diversa dimensione in base al clade di appartenenza (**tabella 4**). Tutti i primers sono stati usati nella stessa reazione di PCR che è stata eseguita secondo le seguenti condizioni:

- 4 minuti di denaturazione iniziale a 94°C;
- 30 cicli composti da: 5 secondi a 94°C, 30 secondi per la fase di annealing a 60°C e 2 minuti di allungamento a 72°C;
- 5 minuti di step finale di estensione a 72°C.

Terminata la reazione, è stata fatta una corsa elettroforetica, secondo le condizioni già descritte precedentemente.

Tabella 4. Primers usati per PCR allele-specifica e dimensione dei prodotti di amplificazione (Clermont et al., 2011).

Gene target	Clade	Primer	Sequenza nucleotidica	Dimensione amplificati (bp)
<i>aes</i>	I	aesI.1	5'-CCTCTACTCACCCAAAAGTC-3'	315
		aesI.2	5'-ATCACGTAACCACAACGCAC-3'	
	II	aesII.1	5'-CGCCTGTTGTCACCTCCACG-3'	125
		aesII.2	5'-GTTTATCACGCAGCCACAAG-3'	

<i>chuA</i>	III	chuIII.1	5'-GTGTTGAGATTGTCCGTGGG-3'	183
		chuIII.2	5'-CAAAAGCACTGGCGCCCAG-3'	
	IV	chuIV.1	5'-CTGGCGAAAGGAACCTGGA-3'	461
		chuIV.2	5'-GTTATCTCATCTTGCAGCCAA-3'	
	V	chuV.1	5'-ACTGTATGGCAGTGGCGCAT-3'	600
		chuV.2	5'-GCAAAACTATCGGCAAACAGC-3'	

2.4 Determinazione della sensibilità agli antibiotici: metodo della diffusione in agar da dischetto

La sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *E. coli* è stata valutata con il metodo della diffusione in agar da dischetto, anche noto come antibiogramma, secondo le procedure riportate dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Questa tecnica consiste nel misurare l'alone di inibizione della crescita batterica che si crea intorno ad un dischetto contenente una quantità nota di antibiotico, quando viene depositato sulla superficie di una piastra di Mueller Hinton agar (MHA, Oxoid, Basingstoke, Regno Unito) in cui è stato precedentemente seminato il ceppo batterico da analizzare.

Si procede con l'allestimento di una brodocoltura del ceppo da esaminare che viene standardizzata in modo da ottenere una densità ottica di 0,1 alla lunghezza d'onda di 625nm (che corrisponde a $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml). Successivamente, la sospensione batterica standardizzata viene seminata sulla superficie di una piastra di MHA, utilizzando un tampone sterile, cercando di ottenere una crescita confluyente. Con l'ausilio di pinze sterili, vengono depositati sulla piastra seminata i dischetti di antibiotico. Le piastre vengono poi incubate a 37°C per 18-24 ore. Come controllo viene utilizzato il ceppo di riferimento *E. coli* ATCC 25922. Il giorno successivo si misura il valore, espresso in millimetri, del diametro dell'alone di inibizione della crescita batterica (ove presente) attorno a ciascun dischetto di antibiotico. Il valore dei diametri ottenuti per ciascun antibiotico viene confrontato con quelli riportati nelle tabelle di riferimento (CLSI, 2017), per determinare se il ceppo risulta sensibile, intermedio o resistente all'antibiotico testato. Nella **tabella 5** vengono mostrati gli antibiotici utilizzati in questo studio e i relativi criteri di interpretazione.

I ceppi resistenti ai β -lattamici sono stati anche analizzati per la produzione delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) attraverso test di screening e di conferma (CLSI, 2017). Viene eseguito un classico antibiogramma in cui vengono utilizzati i dischetti di cefotaxime e ceftazidime da soli ed in

combinazione con l'acido clavulanico. Per valutare la produzione di ESBL vengono confrontati i diametri di inibizione dei due antibiotici utilizzati da soli ed in combinazione con l'acido clavulanico. I diametri attesi per gli antibiotici utilizzati singolarmente sono: ≤ 27 mm per il cefotaxime e ≤ 22 mm per il ceftazidime; un incremento del diametro ≥ 5 mm per ciascun antibiotico testato in combinazione con l'acido clavulanico indica la produzione di ESBL da parte del ceppo saggiato. Anche in questi saggi è stato impiegato *E. coli* ATCC 25922 come ceppo di riferimento (CLSI, 2017).

Tabella 5. Elenco degli antibiotici saggiati attraverso il metodo della diffusione in agar da dischetto e criteri di interpretazione (CLSI, 2017).

Antibiotico	Range ATCC 25922 (mm)	Criterio di interpretazione (diametro in mm)		
		Sensibile	Intermedio	Resistente
Ampicillina (10 μ g)	16-22	≥ 17	14-16	≤ 13
Cefotaxime (30 μ g)	29-35	≥ 26	23-25	≤ 22
Gentamicina (10 μ g)	19-26	≥ 15	13-14	≤ 12
Ciprofloxacina (5 μ g)	30-40	≥ 21	16-20	≤ 15
Tetraciclina (30 μ g)	18-25	≥ 15	12-14	≤ 11
Cloramfenicolo (30 μ g)	21-27	≥ 18	13-17	≤ 12
Acido Nalidixico (30 μ g)	22-28	≥ 19	14-18	≤ 13
Trimethoprim/Sulfametossazolo (1,25/23,75 μ g)	23-29	≥ 16	11-15	≤ 10
Streptomicina (10 μ g)	12-20	≥ 15	12-14	≤ 11

2.5 Saggi di PCR (Polymerase Chain Reaction) per la ricerca dei geni di resistenza

I ceppi di *E. coli* risultati resistenti ai saggi di sensibilità agli antibiotici sono stati ulteriormente esaminati attraverso reazioni di PCR per la ricerca dei seguenti determinanti di resistenza: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* (geni che codificano per le ESBL) per la resistenza ai β -lattamici; *tet(A)* per la resistenza alle tetracicline; *dfrA1* per la resistenza al trimetoprim/sulfametossazolo; *strA*, *strB*, *aadA* e *ant(3'')* per la resistenza agli aminoglicosidi. Ciascuna reazione di amplificazione è stata eseguita su un volume finale di 25 μ l e in **tabella 6** sono riportate le varie componenti della miscela di reazione (MIX). 22 μ l della MIX vengono distribuiti in ciascuna delle vials (una per campione) alla quale vengono aggiunti 3 μ l di DNA del ceppo da saggiare. Il DNA utilizzato è quello estratto seguendo il protocollo illustrato nel paragrafo 2.2.

Nelle **tabelle 7 e 8** sono indicati i programmi di amplificazione e le sequenze delle coppie di primers impiegate.

Tabella 6. Miscela di reazione (MIX) per saggi di amplificazione.

COMPONENTI MIX	VOLUME (μ l)	CONCENTRAZIONE FINALE
H ₂ O	18,55	
dNTP (10mM)	0,5	200 μ M
Buffer 10X (+ MgCl ₂ 20mM)	2,5	1X
Primer forward (100 μ M)	0,125	0,5 μ M
Primer reverse (100 μ M)	0,125	0,5 μ M
DreamTaq 5U/ μ l	0,2	1U

Tabella 7. Programmi di amplificazione utilizzati.

Gene target	Primer	Dimensioni amplificati (bp)	Programma di amplificazione	
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	861	94°C 4:00 94°C 0:50 50°C 0:40 30X 72°C 1:00 72°C 7:00	
	TEM-R			
<i>bla_{SHV}</i>	OS-5	797		
	OS-6			
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-MU1	550		94°C 4:00 94°C 0:45 54°C 0:45 30X 72°C 1:00 72°C 5:00
	CTX-MU2			

<i>tet(A)</i>	tetF	387	<u>94°C 4:00</u> 94°C 0:30 58°C 0:30 <u>72°C 0:45</u> 72°C 7:00	30X
	tet(A)-R			
<i>dfrA1</i>	dfrA1-F	367	<u>94°C 4:00</u> 94°C 0:45 60°C 0:45 <u>72°C 0:45</u> 72°C 7:00	30X
	dfrA1-R			
<i>strA</i>	strA-F	548	<u>94°C 4:00</u> 94°C 0:45 58°C 0:45 <u>72°C 0:45</u> 72°C 7:00	30X
	strA-R			
<i>strB</i>	strB-F	509		
	strB-R			
<i>aadA</i>	aadA-F	447		
	aadA-R			
<i>ant(3'')</i>	ant(3'')-F	295		
	ant(3'')-R			

Tabella 8. Sequenze dei primers utilizzati nelle reazioni di PCR.

Primer	Sequenza nucleotidica	Riferimento bibliografico
TEM-F	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	Mugnaioli et al., 2006
TEM-R	5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'	
OS-5	5'-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3'	Cao et al., 2002
OS-6	5'-GATTTGCTGATTCGCTCGG-3'	

CTX-MU1	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3'	Mugnaioli et al. 2006
CTX-MU2	5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3'	
tetF	5'-GCGCTNTATGCGTTGATGCA-3'	Jun et al., 2004
tet(A)-R	5'-ACAGCCCGTCAGGAAATT-3'	
dfrA1-F	5'-GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC-3'	Lapierre et al., 2008
dfrA1-R	5'-GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC-3'	
strA-F	5'-CTTGGTGATAACGGCAATTC-3'	Srinivasan et al., 2008
strA-R	5'-CCAATCGCAGATAGAAGGC-3'	
strB-F	5'-ATCGTCAAGGGATTGAAACC-3'	
strB-R	5'-GGATCGTAGAACATATTGGC-3'	
aadA-F	5'-TATCCAGCTAAGCGCGAACT-3'	Lapierre et al., 2008
aadA-R	5'-ATTTGCCGACTACCTTGGTC-3'	
ant(3'')-F	5'-CAGCGCAATGACATCTTGC-3'	Srinivasan et al., 2008
ant(3'')-R	5'-GTCGGCAGCGACATCCTTCG-3'	

Terminata la reazione di amplificazione, gli amplificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% contenente Gel Red (0,1 µl/ml), in TAE 1X a 80-90 V. Come peso molecolare standard è stato utilizzato il GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.

2.6 PBRT (PCR-based replicon typing)

Il kit PBRT 2.0 (Diatheva, Fano, Italia) è una metodica basata sulla PCR che permette, in modo semplice e rapido, l'identificazione e tipizzazione dei plasmidi più comuni delle *Enterobacteriaceae*. Il kit fornisce un set di 8 miscele di reazione di PCR ottimizzate per effettuare 8 multiplex PCR che permettono l'amplificazione di 30 tipi di repliconi (o gruppi di incompatibilità). Ciascuna miscela contiene più coppie di primer che amplificano ciascuna differenti regioni (come i geni *rep*, interoni o RNAI) coinvolte nella replicazione dei plasmidi. Ogni coppia di primer è specifica per un determinato gruppo plasmidico.

In **tabella 9** viene riportata la lista dei plasmidi di riferimento, uno per ciascun replicone rilevato dal kit PBRT, e il corrispondente gruppo di incompatibilità. I repliconi che non sono stati associati ad alcun gruppo Inc sono riportati in tabella come “non assegnati”.

Tabella 9. Repliconi rilevati dal kit PBRT 2.0 (Diatheva, Fano, Italia).

REPLICONI	DIMENSIONI (bp)	PLASMIDI DI RIFERIMENTO	GRUPPO Inc
HI1	534	<i>Salmonella typhi</i> R27	IncHI1
HI2	298-308	<i>Serratia marcescens</i> R478	IncHI2
HIB-M	570	<i>K. pneumoniae</i> pNDM-MAR	Non assegnato
FIB-M	440	<i>K. pneumoniae</i> pNDM-MAR	Non assegnato
I1 α	159	<i>S. enterica</i> Typhimurium R64	IncI1 α
I1 γ	161	<i>S. enterica</i> Typhimurium R621a	IncI1 γ

I2	316	<i>Escherichia coli</i> R721	IncI2
M	741	<i>Citrobacter freundii</i> pCTX-M3	IncM
L	854	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pOXA-48	IncL
K	190	<i>Escherichia coli</i> R387	IncK
B/O	159	<i>Escherichia coli</i> p3521	IncB/O
A/C	418	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA1	IncA/C
N	514	<i>Escherichia coli</i> R46	IncN
N2	177	<i>Escherichia coli</i> P271A	IncN2
W	242	<i>Escherichia coli</i> R721	IncW
P1	345	pBS228	IncP1-alpha
T	750	<i>Proteus vulgaris</i> Rts1	IncT
U	843	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA3	IncU
R	248	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pK245	Non assegnato
X1	370	<i>Escherichia coli</i> pOLA52	IncX1
X2	376	<i>Escherichia coli</i> R6K	IncX2
X3	284	<i>K. pneumoniae</i> pIncX-SHV	IncX3
X4	172	<i>Escherichia coli</i> pUMNF18_32	IncX4
FIA	462	<i>Escherichia coli</i> Plasmid F	IncF
FIB	683	<i>Escherichia coli</i> Plasmid F	IncF
FII	288-292	<i>Escherichia coli</i> NR1	IncFII
FIIS	259-260	<i>S. enterica</i> Typhimurium pSLT	IncFIIS
FIIk	142-148	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKPN3	IncFIIk
FIB KN	631	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKPN-IT	IncFIIK
FIB KQ	258	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKpQIL-IT	IncFIIK

Ogni reazione di amplificazione è stata realizzata su un volume finale di 25µl; 23,8µl di ciascuna mix sono addizionati a 0,2µl di DNA polimerasi (5U/µl). Una volta che le 8 MIX sono pronte, 1µl di DNA di ciascun ceppo da saggiare viene aggiunto a 24 µl di ogni specifica mix.

Il programma di amplificazione che è stato utilizzato è il seguente:

- un ciclo a 95°C per 10 minuti;
- 25-30 cicli composti da: un minuto a 95°C, 30 secondi a 60°C e un minuto a 72°C;
- un ciclo a 72°C per 5 minuti.

Terminata la reazione di amplificazione è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2,5%, contenente il Gel Red come agente intercalante del DNA, utilizzando una camera elettroforetica con tampone TAE 1X e applicando una corrente di 80 Volt. Come standard molecolare è stato utilizzato il GeneRuler™ 100bp DNA Ladder.

2.7 Coniugazione

La capacità di trasferire i geni responsabili della resistenza alla tetraciclina è stata verificata attraverso esperimenti di coniugazione su filtro utilizzando come donatori un ceppo isolato da sedimento (PN30) e uno da vongole (ISZ 220). Come ricevente è stato utilizzato il ceppo *E. coli* 1816, un mutante di *E. coli* C600, lattosio non fermentante, resistente alla rifampicina e all'acido nalidixico.

Le brodocolture overnight del donatore e del ricevente vengono portate ad un valore di OD₆₇₅ pari a 0,4 (fase esponenziale), mescolate in rapporto di 1:10 e filtrate attraverso una membrana di nitrocellulosa da 0,45µm (Millipore, Vimodrone, MI, Italia). Successivamente il filtro viene posizionato sterilmente su una piastra di BH agar (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid, Basingstoke, Regno Unito) ed incubato a 37°C per 18-24 ore. Al termine dell'incubazione il filtro viene immerso in 10 ml di soluzione fisiologica sterile ed agitato al vortex in modo da rimuovere completamente le cellule batteriche dalla sua superficie. Successivamente si elimina il filtro e la sospensione batterica viene centrifugata a 5800 x g per 10 minuti; il pellet viene, infine, risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. Da questa soluzione vengono effettuate delle diluizioni scalari fino a raggiungere la diluizione di 10⁻⁷. 100 µl delle diluizioni adeguate sono stati piastrati su piastre di BH agar selettive contenenti: tetraciclina (20

µg/ml) per la selezione del donatore; rifampicina (50 µg/ml) e acido nalidixico (50 µg/ml) per la selezione del ricevente; tutti e tre gli antibiotici per la selezione dei transconiuganti. Dopo 24-48 ore di incubazione a 37°C si procede alla conta delle colonie per determinare la frequenza di trasferimento, espressa come rapporto tra il numero (CFU/ml) di transconiuganti sul numero (CFU/ml) di ricevente. I transconiuganti sono stati poi confermati con tre passaggi su piastre di MacConkey agar (Oxoid) contenente tutti e tre gli antibiotici alle concentrazioni utilizzate per la selezione.

2.8 S1-Pulsed Field Gel Electrophoresis (S1-PFGE)

L'elettroforesi in campo pulsato del DNA totale trattato con l'enzima nucleasi S1 (S1-PFGE) è stata utilizzata per definire il numero e le dimensioni dei plasmidi eventualmente presenti nei ceppi in esame.

La tecnica è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Gautom (Gautom, 1997). In breve, una colonia del ceppo da saggiare viene inoculata in 5 ml di BH brodo (Oxoid) ed incubata a 37°C overnight. Il giorno seguente la coltura allestita viene centrifugata a 5000 rpm per 10 minuti e il pellet risospeso in 5 ml di SE buffer (NaCl 75mM pH 8.0; EDTA 25mM pH 8.0). Si ripete il passaggio appena descritto e la sospensione viene diluita fino a raggiungere una concentrazione di DNA approssimativa di 10 µg/ml. 500µl della sospensione

batterica vengono aggiunti a 500 μ l di agarosio Low Melting all'1,6% (CertifiedTM Low Melt Agarose, Bio-Rad Laboratories) e distribuiti in appositi stampi per plugs (plug-mold). Una volta solidificate, le plugs vengono incubate per 20 ore a 55°C in 3 ml di soluzione di lisi (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 50mM pH 8,0; N-lauroylsarcosine 1%) contenente 1 mg/ml di proteinasi K. Le plugs vengono quindi lavate 3 volte in 10 ml di TE Buffer (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0).

Metà plug viene poi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente con l'enzima S1 nucleasi (ThermoFisher Scientific) per consentire il taglio del DNA superavvolto e la linearizzazione del DNA plasmidico. Successivamente, la reazione viene bloccata aggiungendo 1 ml di EDTA 0,5M pH 8. Ciascuna plug viene poi caricata su un pettine e inclusa all'interno di un gel di Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) all'1%. Le corse elettroforetiche, in TBE (Trisma Base 1M; acido borico 1M; EDTA 20mM pH 8) 0,5X, sono state effettuate tramite l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Biorad) con le seguenti condizioni: tempo di corsa totale 17 ore, campo 6 V/cm, switch iniziale 0.5 secondi, switch finale 22 secondi, ramping factor lineare. Infine, il gel è stato colorato mediante bromuro d'etidio (0,5 μ g/ml) e visualizzato al transilluminatore. Come marker sono stati utilizzati il Low Range PFG Marker

(New England Biolabs, Ipswich, USA) e il Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, USA).

2.9 Southern blotting e ibridazione

Per determinare la localizzazione del gene *tet(A)* nei donatori, nei transconiuganti e nel ricevente sono stati effettuati dei saggi di Southern blotting, seguiti da ibridazione. I frammenti di DNA ottenuti mediante S1-PFGE vengono trasferiti su membrana di nylon (Zeta-Probe; Bio-Rad) mediante la tecnica del trasferimento capillare. Il gel depurinato e denaturato viene messo a contatto con la membrana di nylon per una notte. Una volta completato il trasferimento, la membrana viene lavata con il buffer di neutralizzazione e successivamente posta sul transilluminatore per permettere il fissaggio del DNA mediante irradiazione con raggi UV. La membrana viene quindi pre-ibridata per 2 ore a 50°C nel tampone Ultra-hyb (Ultrasensitive Hybridization Buffer) (Applied Biosystems, Foster City, USA). Al termine delle due ore viene aggiunta la sonda oligonucleotidica marcata con biotina, denaturata a 100°C per 10 minuti; segue una incubazione overnight. Per la preparazione della sonda *tet(A)* è stato utilizzato un amplificato di 387 bp ottenuto mediante PCR utilizzando come target il DNA dei ceppi ISZ 220 e

PN30. Gli amplificati sono stati prima purificati utilizzando il kit Gene Jet PCR Purification (ThermoFisher Scientific) e poi marcati con biotina con il kit Psoralen-Biotin BrightStar (Ambion, ThermoFisher Scientific).

Dopo l'ibridazione la membrana è stata lavata 6 volte con soluzioni a forza ionica decrescente (2X, 1X, 0,3X) di sodio citrato (SSC) Buffer e sodio dodecilsolfato (SDS) 0,1% per rimuovere la sonda in eccesso. Le soluzioni di lavaggio contenenti SSC alle diverse concentrazioni vengono preparate diluendo soluzioni stock di SSC 20X, pH7 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3M, NaCl 3M) e SDS 10%. Una volta conclusa la serie di lavaggi, la rilevazione del segnale viene effettuata conformemente a quanto indicato nel kit di marcatura. L'aggiunta di streptavidina genera, in combinazione con la biotina, un segnale luminoso rilevabile sulla lastra fotografica dopo 2-5 minuti di esposizione.

2.10 Analisi statistica

Le differenze nella prevalenza dei diversi repliconi sono state analizzate mediante il test X^2 ; invece, la significatività dell'associazione tra un tipo di replicone e la resistenza ad uno specifico antibiotico o l'appartenenza ad uno specifico filogruppo è stata valutata attraverso il test di Fisher. È stato considerato significativo un valore di $p < 0,05$.

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 Determinazione del gruppo filogenetico di appartenenza dei ceppi di Escherichia coli utilizzati

In questo lavoro di tesi sono stati esaminati un numero complessivo di 103 isolati di *E. coli*, provenienti da campioni di vongole e di sedimento marino raccolti approssimativamente nelle stesse aree di campionamento. I 53 ceppi isolati da vongole sono stati scelti da una collezione di 141 ceppi, forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (sede di Ancona, Italia) e precedentemente caratterizzati. I 53 ceppi di *E. coli* isolati dalle vongole si distribuiscono fra tutti i gruppi filogenetici con una predominanza del filogruppo A (n=21), mentre 6 ceppi appartengono ai cryptic clades (III, IV e V); un solo isolato non era tipizzabile e quindi non è stato assegnato ad alcun filogruppo (Vignaroli et al., 2016; **tabella 10**).

Per quanto riguarda i 50 ceppi di *E. coli* provenienti da campioni di sedimento, invece, la maggior parte di essi provengono dal sito PN (n=41) e sono distribuiti tra tutti i filogruppi, eccetto il filogruppo E ed il filogruppo F; soltanto due

ceppi, sempre provenienti da campioni raccolti dal sito PN, appartengono ai cryptic clades, entrambi al clade V (**tabella 10**).

Tabella 10. Filogruppi e cryptic clades dei ceppi analizzati provenienti da campioni di vongole e sedimenti.

CEPPI DA VONGOLE		CEPPI DA SEDIMENTI	
Filogruppo	N° di ceppi	Filogruppo	N° di ceppi
A	21	A	16
B1	7	B1	13
B2	4	B2	10
C	2	C	3
D	6	D	4
E	5	E	0
F	1	F	2
Non tipizzabile	1	Non tipizzabile	-
Clade I	-	Clade I	-
Clade II	-	Clade II	-
Clade III	1	Clade III	-
Clade IV	1	Clade IV	-
Clade V	4	Clade V	2
Totale	53	Totale	50

3.2 Resistenza agli antibiotici degli isolati di *E. coli*

I 103 ceppi di *E. coli* sono stati testati per la sensibilità a nove antibiotici mediante il metodo della diffusione in agar da dischetto. La percentuale di ceppi che sono risultati resistenti a ciascuno degli antibiotici saggiati è riportata in **figura 1**.

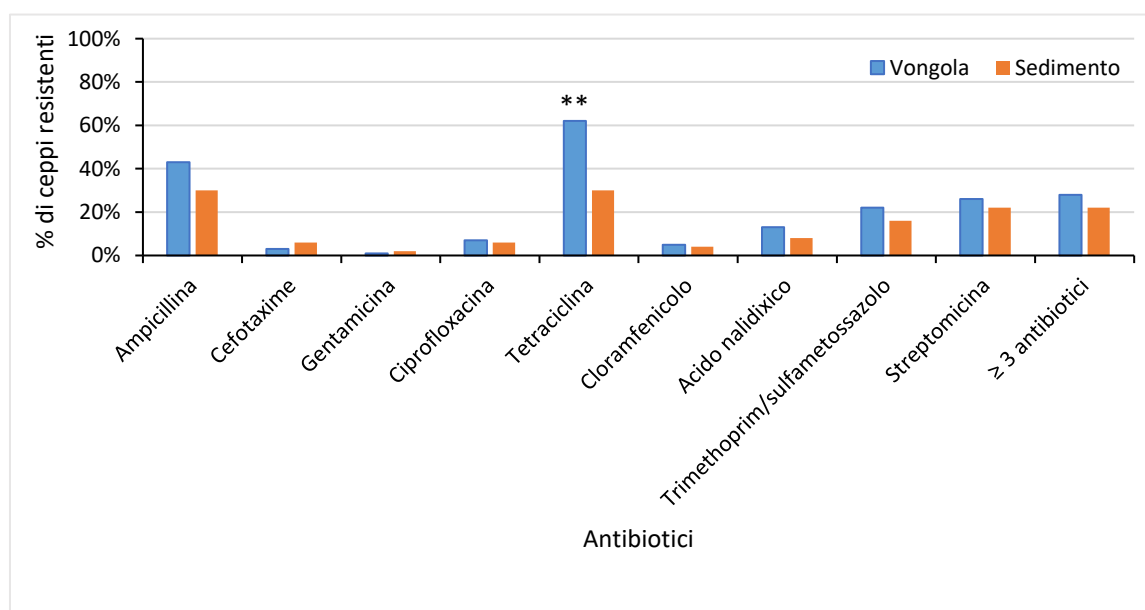


Figura 1. Prevalenza di ceppi resistenti in isolati provenienti da vongola e da sedimento. **Altamente significativo ($p=0,0015$).

Tra i 53 ceppi da vongola la resistenza risultata più frequente è quella alla tetraciclina (62%; $n=33$), seguita dalla resistenza all'ampicillina (43%; $n=23$) e alla streptomicina (26%; $n=14$), risultati coerenti con quanto riportato in un lavoro precedente (Vignaroli et al., 2016); la resistenza alla tetraciclina è risultata significativamente più frequente ($p=0,0015$) nei ceppi provenienti

dalle vongole rispetto a quelli provenienti dal sedimento (**figura 1**). Inoltre, 15 ceppi (28%) sono risultati resistenti a tre o più antibiotici e classificati quindi come multiresistenti.

Tra i 50 ceppi da sedimento, la resistenza alla tetraciclina (30%; n=15) e quella all'ampicillina (30%; n=15) sono le resistenze riscontrate più di frequente, seguite dalla resistenza alla streptomicina (22%; n=11): tali risultati sono in linea con quelli ottenuti con i ceppi da vongola e anche nell'ambito di questi ceppi una buona percentuale (22%; n=11) è da considerare multiresistente.

In rapporto alla distribuzione nei vari filogruppi, i ceppi risultati resistenti agli antibiotici sono significativamente ($p < 0,05$) più numerosi nel filogruppo A (75,6%) che negli altri filogruppi (56%) mentre i ceppi appartenenti ai cryptic clades sono sensibili a tutti gli antibiotici testati.

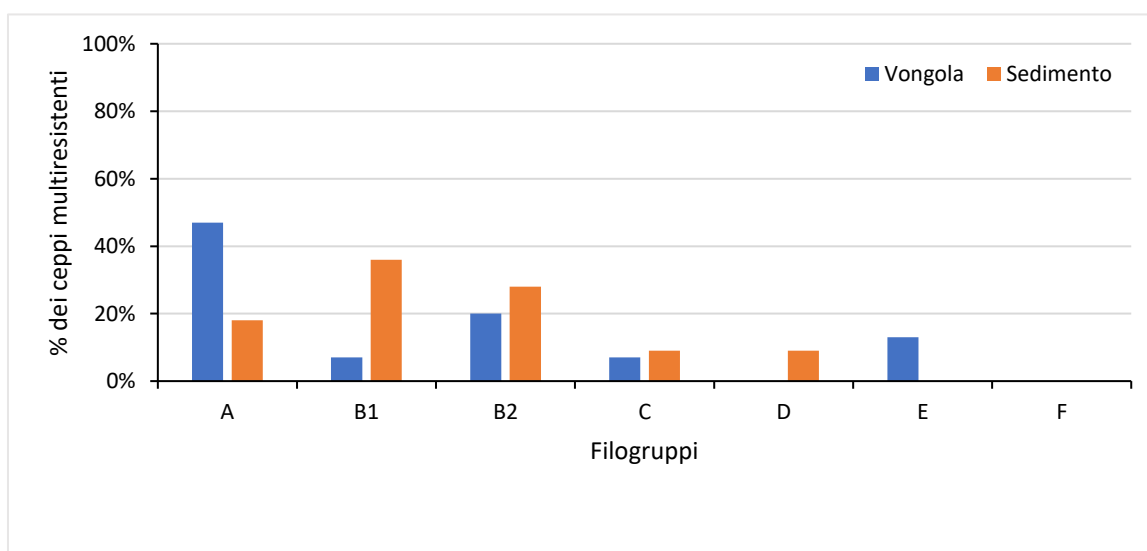


Figura 2. Distribuzione dei ceppi multiresistenti (MDR) tra i diversi filogruppi.

In particolare, tra i ceppi multiresistenti da campioni di vongola, molti di essi appartengono al filogrupo A (47%), B2 (20%) ed E (13%) mentre nessuno appartiene al filogrupo D od F; i ceppi multiresistenti da campioni di sedimento, invece, sono maggiormente distribuiti tra il filogrupo B1 (36%), B2 (28%) ed A (18%) e nessuno di essi appartiene al filogrupo F (**figura 2**). Sia nei ceppi da vongola che in quelli da sedimento la multiresistenza non è tuttavia associata significativamente ad alcun filogrupo (**figura 2**).

3.3 Ricerca di geni di resistenza mediante saggi di PCR

Poiché le resistenze più diffuse erano quelle alla tetraciclina, ai beta-lattamici e alla streptomina, i ceppi sono stati analizzati per la presenza dei più comuni determinanti di resistenza a questi antibiotici, mediante PCR. In **figura 3** viene mostrata la percentuale di ceppi di *E. coli* resistenti che sono risultati positivi ai relativi geni di resistenza. Nei ceppi resistenti provenienti da campioni di vongola, il 91% (n=21) dei ceppi ampicillino-resistenti è produttore di ESBL e l'83% (n=19) è risultato positivo per il gene *bla_{TEM}* mentre il 73% (n=24) dei ceppi resistenti alla tetraciclina è risultato positivo per il gene *tet(A)*. Tra i ceppi resistenti alla streptomina (n=14), i geni *strA* e *strB* sono stati riscontrati più frequentemente con percentuali rispettivamente dell'86% (n=12) e del 57%

(n=8), seguiti dal gene *aadA* (n=7; 50%) e dal gene *ant(3'')* (n=3; 21%); inoltre, il gene *aadA* è significativamente (p=0,03) più comune nei ceppi da vongola che nei ceppi da sedimento (**figura 3**).

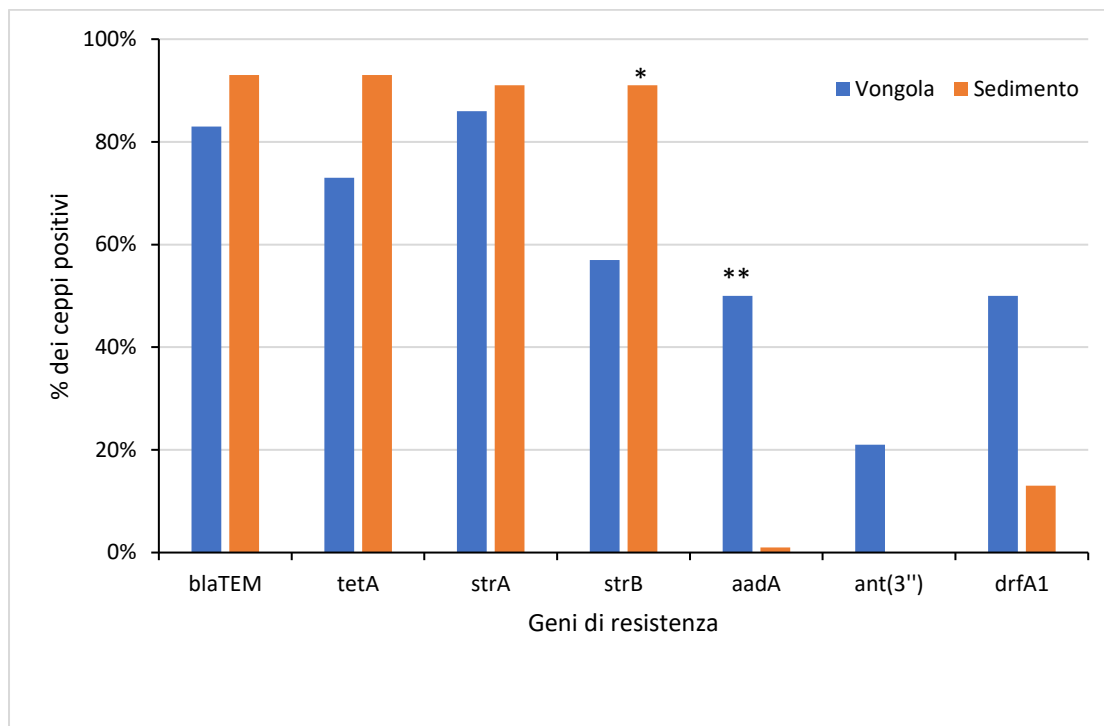


Figura 3. Prevalenza di geni di resistenza tra ceppi resistenti provenienti dalle vongole e dal sedimento. **Statisticamente significativo (p=0,03). *Scarsa significatività (p=0,09).

Negli isolati resistenti provenienti da campioni di sedimento, invece, un'elevata percentuale dei ceppi ampicillino-resistenti (93%; n=14) è risultata positiva al test di produzione delle ESBL e porta il gene *bla_{TEM}* mentre solo il ceppo *E. coli* PN42 ed il ceppo *E. coli* PN15 sono rispettivamente positivi per il gene *bla_{SHV}* e per il gene *bla_{CTX-M}*. Inoltre, 14 su 15 ceppi resistenti alla tetraciclina (93%) portano il gene *tet(A)* e il 91% (n=10) degli isolati resistenti alla

streptomicina sono risultati positivi per *strA* e *strB*; invece, il gene *ant(3'')* non è stato rilevato in nessun ceppo mentre solo il ceppo *E. coli* PN56 porta sia *aadA* che *dfrA1*, quest'ultimo associato alla resistenza al trimethoprim.

3.4 Tipizzazione plasmidica degli isolati di *E. coli*

Tutti i 103 ceppi di *E. coli* sono stati sottoposti a tipizzazione plasmidica mediante il kit PBRT (PCR-based replicon typing) e i risultati ottenuti sono riportati in **figura 4**.

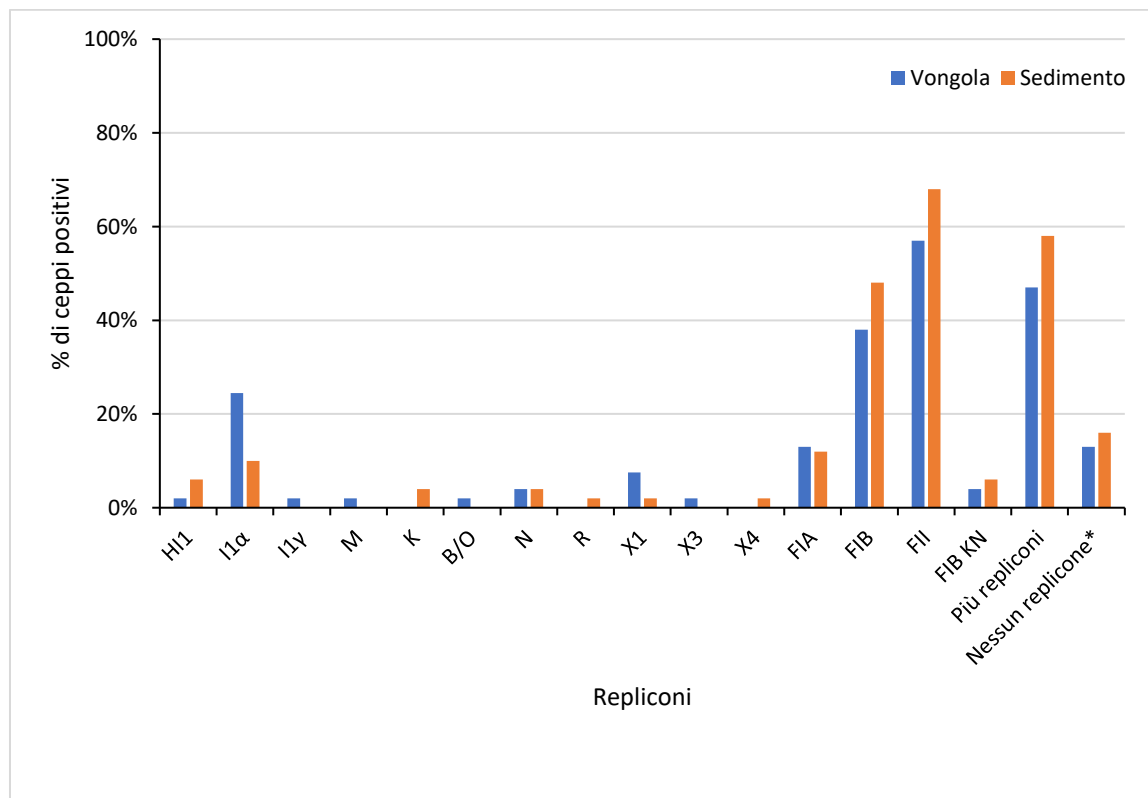


Figura 4. Prevalenza dei repliconi rilevati dal kit PBRT nei ceppi di *E. coli*. *Negativi per tutti i repliconi rilevati dal kit.

Dei 30 repliconi che vengono rilevati dal kit, 12 e 11 repliconi sono stati rispettivamente individuati tra i ceppi provenienti dalle vongole e dal sedimento, con 8 repliconi comuni ad entrambe le categorie di ceppi sebbene con differenti frequenze. Sia negli isolati da vongola che in quelli da sedimento i repliconi più diffusi sono FII e FIB, che sono portati da plasmidi appartenenti al gruppo di incompatibilità IncF. Tali repliconi sono stati rilevati nel 66% dei ceppi da campioni di vongola (n=35) e nel 74% (n=37) dei ceppi da sedimento; in particolare, la combinazione dei repliconi FIB-FII è significativamente (p=0,03) più frequente sia nei ceppi da sedimento (54%) che nei ceppi da vongola (28,6%). Anche il replicone I1 α è risultato frequente soprattutto tra i ceppi da vongola (24,5%; n=13) rispetto ai ceppi da sedimento (10%; n=5), nonostante la differenza non sia significativa.

54 su 103 ceppi analizzati (53%) contengono più di un replicone mentre 7 ceppi isolati dalle vongole e 8 ceppi isolati dai sedimenti sono risultati negativi per tutti i tipi di replicone rilevati dal kit PBRT; inoltre, esperimenti di S1-PFGE hanno confermato che 14 su 15 dei ceppi non tipizzabili con il kit sono privi di plasmidi. Anche gli 8 ceppi appartenenti ai cryptic clades sono stati analizzati con il kit e mentre quelli provenienti dal sedimento contengono solo repliconi tipici di plasmidi della famiglia IncF, quelli isolati dalle vongole sono risultati

positivi anche per repliconi del gruppo di incompatibilità IncI, soprattutto il replicone I1 α .

Inoltre, è stata valutata l'associazione tra l'antibiotico-resistenza e plasmidi appartenenti a specifiche famiglie Inc: l'unica associazione statisticamente significativa è quella tra la resistenza all'ampicillina e i repliconi della famiglia IncF nei ceppi provenienti da campioni di vongola ($p=0,007$), come mostrato in **figura 5**.

Infine, è stato osservato che, eccetto il ceppo *E. coli* ISZ 281, tutti i ceppi multiresistenti (MDR) provenienti da campioni di vongola hanno repliconi della famiglia IncF e solo tre di essi portano la combinazione FIB-FII mentre la maggior parte porta il replicone FII da solo. Al contrario, tutti i ceppi multiresistenti provenienti da campioni di sedimento ($n=11$) contengono repliconi multipli di IncF, con la combinazione FIB-FII che è predominante (64%; $n=7$).

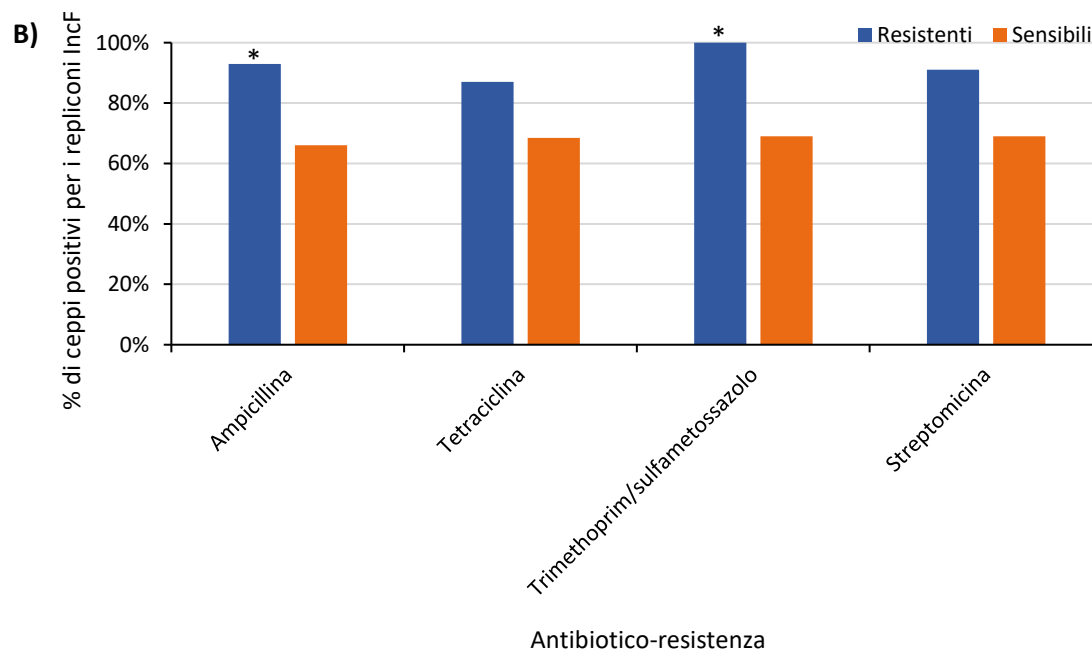
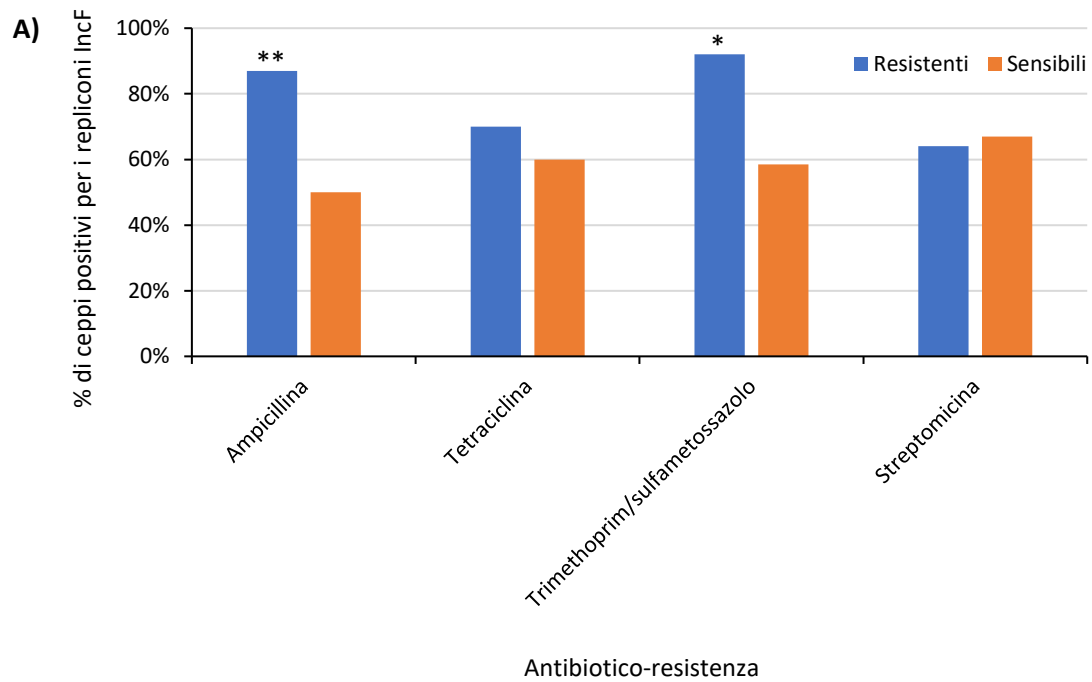


Figura 5. Associazione tra l'antibiotico-resistenza e i repliconi della famiglia IncF negli isolati provenienti dalle vongole (**A**) e dal sedimento (**B**). **Statisticamente significativo ($p=0,007$). *Scarsa significatività ($p=0,07-0,09$).

3.5 Profilo plasmidico dei ceppi di *E. coli* mediante S1-PFGE

I 14 ceppi di *E. coli* che sono risultati positivi per il gruppo IncI1 α , di cui 9 provenienti dalle vongole e 5 dai sedimenti, sono stati sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato dopo digestione del DNA totale con la nucleasi S1 (S1-PFGE). Questa tecnica ci ha permesso, infatti, di determinare il numero e le dimensioni dei plasmidi presenti in ciascuno dei ceppi testati. L'analisi delle bande ottenute dalla corsa elettroforetica ha evidenziato che tutti gli isolati esaminati portano almeno un plasmide fino a un massimo di tre e che le loro dimensioni variano da 40 a 145 kb. In **tabella 11** sono indicati i risultati ottenuti, in rapporto ai geni di resistenza e ai tipi di replicone portati da ciascun ceppo.

Tabella 11. Ceppi di *E. coli* positivi per il gruppo IncI1 α : geni di resistenza, repliconi e dimensioni dei plasmidi.

Ceppi da vongola	Geni di resistenza	Repliconi	Dimensioni dei plasmidi (~kb)
ISZ 220	<i>bla_{TEM}, tet(A), dfrA1, aadA</i>	I1 α – FIB – FII – M	110, 95, 55
ISZ 276	<i>strA, strB</i>	I1 α	90
ISZ 61	<i>bla_{TEM}, dfrA1, strA, aadA, ant(3'')</i>	I1 α – FIB – FII – N	140, 80, 40
ISZ 280	-	I1 α	85
ISZ 210	-	I1 α - FIB	110, 95
ISZ 211	-	I1 α – FIB – FIA	80, 40
ISZ 255	-	I1 α	80

ISZ 274	<i>bla_{TEM}</i>	I1 α	90
ISZ 325	<i>tet(A)</i>	I1 α	90
Ceppi da sedimento	Geni di resistenza	Repliconi	Dimensioni dei plasmidi (~kb)
PN41	<i>tet(A)</i>	I1 α	95
PN44	<i>tet(A)</i>	I1 α	95
PN16	-	I1 α	85
PN29	<i>bla_{TEM}, tet(A), strA, strB</i>	I1 α – FIB – FII	145, 75
PN30	<i>bla_{TEM}, tet(A), strA, strB</i>	I1 α – FIB – FII	145, 75

3.6 Risultati degli esperimenti di coniugazione

Per verificare se i plasmidi del gruppo IncI1 α fossero coinvolti nel trasferimento dell'antibiotico-resistenza, sono stati eseguiti esperimenti di coniugazione utilizzando come donatori ceppi resistenti alla tetraciclina che fossero positivi per il gene *tet(A)* e per il replicone I1 α . Dall'incrocio tra il ceppo donatore *E. coli* ISZ 220 (da vongola) ed il ceppo ricevente *E. coli* 1816 e dall'incrocio tra il ceppo donatore *E. coli* PN30 (da sedimento) e lo stesso ceppo ricevente, la resistenza alla tetraciclina è stata trasferita rispettivamente alle frequenze di $4,8 \times 10^{-3}$ e $1,2 \times 10^{-7}$.

Per verificare che fosse avvenuto il trasferimento plasmidico, i transconiuganti derivanti dai due incroci sono stati esaminati per il loro profilo plasmidico e per i loro determinanti di resistenza: si è ottenuto che tutti i transconiuganti hanno

acquisito i geni di resistenza ma non tutti i plasmidi dei rispettivi donatori (**tabella 11 e figura 6a**). Infatti, l'S1-PFGE ha mostrato che il ceppo donatore *E. coli* ISZ 220 ha trasferito due dei suoi tre plasmidi, ovvero quello di circa 110 kb e quello di circa 55 kb; inoltre, l'utilizzo del kit PBRT ha confermato che i transconiuganti sono risultati positivi per i repliconi I1 α ed M ma non per il replicone F. Al contrario, il ceppo donatore *E. coli* PN30 ha trasferito solo il plasmide IncF (~145kb), nonostante porti anche un plasmide IncI1 (~75kb), come viene mostrato da esperimenti di S1-PFGE condotti sui transconiuganti e confermato dalle reazioni di PCR con il kit PBRT.

3.7 Localizzazione plasmidica del gene tet(A)

Saggi di ibridazione compiuti sui ceppi donatori (*E. coli* ISZ 220 ed *E. coli* PN30), sui transconiuganti e sul ceppo ricevente *E. coli* 1816 hanno evidenziato che il gene *tet(A)* è posizionato sui plasmidi di dimensioni maggiori, ovvero sul plasmide di ~110 kb di *E. coli* ISZ220 e dei relativi transconiuganti, verosimilmente corrispondente al plasmide IncI1, e sul plasmide di ~145 kb di *E. coli* PN30 e dei relativi transconiuganti, probabilmente rappresentato dal plasmide IncF (**figura 6b**).

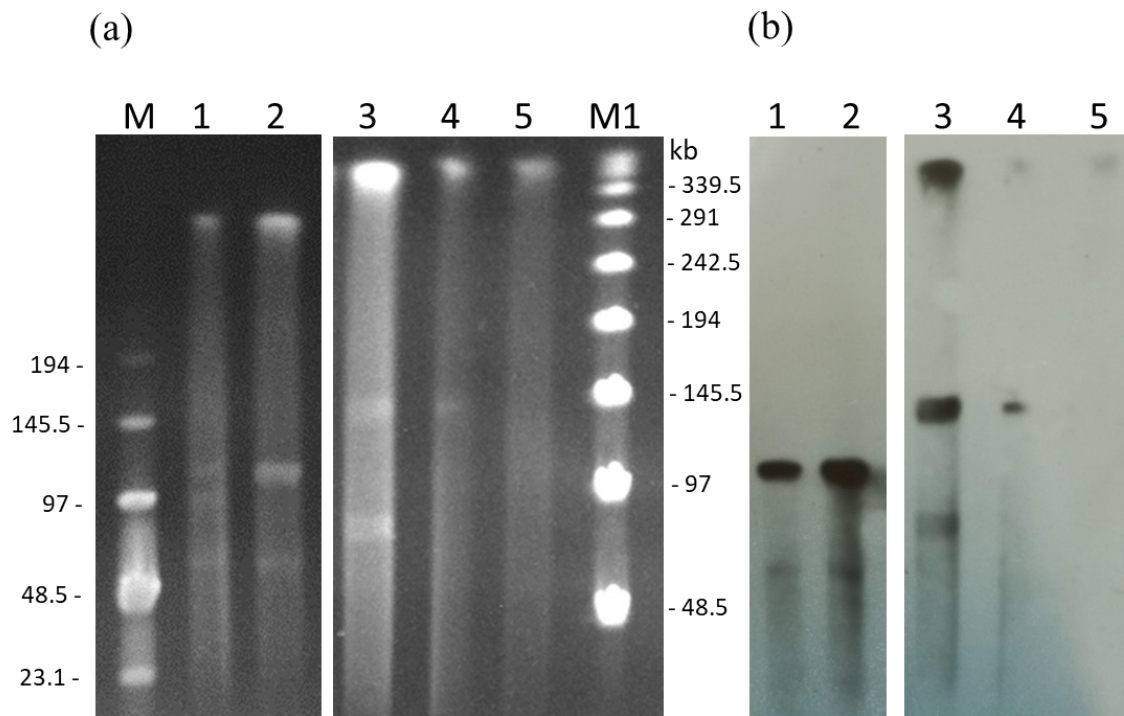


Figura 6. Profili plasmidici dei donatori, transconiuganti e del ricevente ottenuti tramite S1-PFGE **(a)** e ibridazione con una sonda *tet(A)* **(b)**. Su entrambi i lati della **figura a** sono riportate le dimensioni dei frammenti (kb). M, Low Range PFG marker (0,1-200kb); 1, donatore *E. coli* ISZ 220; 2, transconiugante da incrocio *E. coli* ISZ 220 x *E. coli* 1816; 3, donatore *E. coli* PN30; 4, transconiugante da incrocio *E. coli* PN30 x *E. coli* 1816; 5, ricevente *E. coli* 1816; M1, Lambda Ladder PFG Marker (50-1000kb).

Capitolo 4

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La diffusione ormai ubiquitaria di *Enterobacteriaceae* multiresistenti (MDR), specialmente delle specie *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, è fonte di grande preoccupazione; a tal proposito è sufficiente pensare che cloni batterici come *E. coli* ST131 e *K. pneumoniae* ST258 sono tra le principali cause di infezioni nosocomiali e di comunità (Mathers et al., 2015). Nell'ambito dell'epidemiologia, i cloni epidemici vengono solitamente identificati sfruttando il loro genoma, come nella determinazione del "sequence-type" (ST), mentre il DNA plasmidico è spesso trascurato, nonostante abbia un ruolo centrale nel fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Mentre in contesti clinici è stata dimostrata l'associazione tra cloni ad alto rischio e specifici plasmidi coinvolti nella diffusione della resistenza agli antibiotici (Mathers et al., 2015), i ceppi ambientali di *E. coli* non sono stati ancora studiati estesamente circa il loro contenuto plasmidico, sebbene questo possa essere estremamente importante per identificare ceppi pericolosi e per capirne l'origine.

In questo lavoro di tesi, 103 ceppi di *E. coli* isolati da campioni di vongole e di sedimento marino, raccolti lungo la costa dell'Adriatico centrale, sono stati

esaminati per il loro contenuto plasmidico e per determinare, mediante l'utilizzo del kit PBRT, la prevalenza di specifici tipi di repliconi in ceppi ambientali di *E. coli*. È stata valutata anche la trasferibilità di plasmidi contenenti geni di resistenza attraverso esperimenti di coniugazione. Come già rilevato in altri studi (Vignaroli et al., 2013, 2016, Luna et al., 2010) su ceppi di *E. coli* isolati da ambiente marino costiero, nella stessa area geografica, anche in questo lavoro di tesi più del 50% degli isolati di *E. coli* appartenevano ai gruppi filogenetici A (36%; n=37) e B1 (19%; n=20); questi sono stati individuati in tutti i siti di raccolta, in linea con evidenze secondo le quali isolati appartenenti a questi filogruppi occupano diverse nicchie ecologiche e sono stati isolati da un'ampia gamma di ospiti vertebrati. Inoltre, rispetto ai filogruppi B2 e D, sono particolarmente comuni nell'ambiente acquatico probabilmente per la loro maggiore capacità di sopravvivenza in condizioni di stress (Gordon, 2013, Walk et al., 2007). Solo un piccolo gruppo di isolati, 8 su 103 ceppi analizzati, era incluso nei cryptic clades di *Escherichia*, che comprendono ceppi correlati a *E. coli* in quanto fenotipicamente indistinguibili ma divergenti da questa specie dal punto di vista filogenetico. In particolare, i clade II, III, IV e soprattutto V sono isolati raramente da infezioni umane e animali e più frequentemente da campioni ambientali (acqua e suolo) o da animali non mammiferi. Questo ha portato ad ipotizzare la maggiore capacità

di adattamento all'ambiente naturale dei ceppi appartenenti ai cryptic clades (Walk et al., 2009). Studi sulle caratteristiche genotipiche e fenotipiche e soprattutto sulla presenza di plasmidi nei ceppi appartenenti ai cryptic clades sono ancora scarsi.

Il kit PBRT utilizzato in questo lavoro è stato utile nell'identificare i plasmidi più comuni sia nei ceppi di *E. coli* che nei cryptic clades (Citterio & Andreoni et al., 2020). Nonostante il 14,5% degli isolati (n=15) risultava negativo per tutti i repliconi rilevati dal kit, tutti questi ceppi, eccetto uno, erano non tipizzabili perché effettivamente non contenevano DNA plasmidico quando sottoposti ad analisi mediante S1-PFGE. I repliconi più diffusi tra gli isolati esaminati erano quelli del gruppo IncF, risultato coerente con altri lavori secondo cui tali plasmidi sono i più comuni nelle *Enterobacteriaceae*, soprattutto in *E. coli* (Carattoli, 2009); tuttavia, nel continente europeo i plasmidi IncF sono stati descritti prevalentemente negli isolati di origine umana ed animale, non nei ceppi ambientali (Rozwandowicz et al., 2018). Quindi, l'alta frequenza dei plasmidi IncF nei nostri isolati di *E. coli* potrebbe indicare la loro origine umana o animale e una contaminazione fecale del sedimento marino, compreso quello delle aree di raccolta dei molluschi. I plasmidi IncF spesso portano più repliconi, tipicamente il replicone FII insieme ai repliconi FIA e FIB (Rozwandowicz et al., 2018); ad esempio, nei cloni epidemici *E. coli*

ST131 e *K. pneumoniae* ST258 è stata descritta la presenza di plasmidi IncF che spesso contengono la combinazione FIA e FII (Mathers et al., 2015). Nella maggior parte dei ceppi di questo studio positivi per IncF, invece, la combinazione FII-FIB è risultata la più frequente, soprattutto nei ceppi provenienti da campioni di sedimento; questa combinazione è stata trovata anche in uno studio recente (Lambrecht et al., 2018) in ceppi commensali multiresistenti di *E. coli* provenienti da animali da fattoria. Oltre ai plasmidi IncF, anche i plasmidi IncI sono risultati piuttosto frequenti tra i ceppi di questo studio, soprattutto negli isolati da vongola. Anche nei ceppi appartenenti ai cryptic clades isolati da vongole, IncI era il replicone più frequente, sebbene i ceppi fossero sensibili a tutti gli antibiotici testati. In letteratura, i plasmidi IncI sono stati descritti prevalentemente in ceppi di *E. coli* e *Salmonella enterica* isolati da polli (Rozwandowicz et al., 2018) mentre in un altro lavoro (Xie et al., 2016) sia i plasmidi IncI che i plasmidi IncF sono stati trovati in ceppi di *E. coli* multiresistenti e produttori di ESBL isolati da carne al dettaglio. I plasmidi IncI, inoltre, presentano un cluster di geni che codifica un pilo di tipo IV coinvolto nell'adesione alle cellule ospiti (García-Fernández. et al., 2008). La presenza di tali plasmidi anche nei cryptic clades isolati da vongole e sensibili a tutti gli antibiotici potrebbe essere correlata, più che all'antibiotico-resistenza, alla virulenza e alla capacità di aderire alle cellule animali. Tale ipotesi

andrebbe, tuttavia, verificata mediante saggi di PCR (ad esempio per i geni *pil*) e test di adesività. Dunque, la presenza nei ceppi analizzati sia dei plasmidi IncF che dei plasmidi IncI consolida l'ipotesi che la contaminazione delle nostre aree di raccolta possa essere di origine animale.

La multiresistenza è un fenomeno comune nella specie *E. coli* (ECDC, 2019) e la prevalenza della resistenza alla tetraciclina, ai β -lattamici e agli aminoglicosidi sia negli isolati da vongola che in quelli da sedimento è un risultato coerente con quanto riportato in letteratura (Vignaroli et al., 2016, Pormohammad et al., 2019); in particolare, i multiresistenti isolati da vongole appartenevano principalmente al filogruppo A mentre quelli da sedimento al filogruppo B1, linee genetiche che spesso comprendono ceppi commensali intestinali sia umani che animali e si ritrovano frequentemente anche in ambiente acquatico. Tuttavia, multiresistenza e appartenenza ad uno specifico gruppo filogenetico non erano correlati in maniera significativa nei ceppi analizzati in questo studio. Nelle *Enterobacteriaceae*, le antibiotico-resistenze sono comunemente associate ai plasmidi IncF e IncI (Rozwandowicz et al., 2018) e anche in questo lavoro tali gruppi plasmidici sono stati trovati con più frequenza nei ceppi resistenti che nei ceppi sensibili. Inoltre, è stata rilevata un'associazione statisticamente significativa tra la resistenza ai β -lattamici e i plasmidi IncF negli isolati di *E. coli* provenienti dalle vongole, mentre la

multiresistenza non era associata significativamente con nessuna famiglia plasmidica.

Infine, sia i plasmidi IncF che i plasmidi IncI sono plasmidi coniugativi che possono essere coinvolti nel trasferimento dell'antibiotico-resistenza anche tra specie diverse nell'ambito delle *Enterobacteriaceae*. In questo studio tali plasmidi erano coinvolti nella trasmissione della resistenza a diverse classi di antibiotici (tetraciclina, beta-lattamici, aminoglicosidi e trimethoprim), come dimostrato da esperimenti di coniugazione utilizzando donatori di *E. coli* provenienti dal sedimento e dalle vongole. L'acquisizione del plasmide IncF o IncI nei transconiuganti era, infatti, correlata all'acquisizione di più geni di resistenza (*bla*_{TEM}, *strA*, *strB*, *aadA*, *dfrA*), oltre al gene *tet(A)* per la resistenza alla tetraciclina, antibiotico utilizzato come agente di selezione negli incroci.

Per concludere, in questo studio siamo riusciti a valutare la prevalenza di determinati gruppi plasmidici in ceppi di *E. coli* isolati da ambienti naturali, tematica non ancora molto affrontata. Nonostante il kit PBRT sia stato sviluppato per essere impiegato negli isolati umani delle *Enterobacteriaceae*, si è rivelato uno strumento molto efficace anche per tipizzare i plasmidi associati all'antibiotico-resistenza in isolati ambientali di *E. coli*, per valutare la prevalenza di determinati plasmidi e per formulare ipotesi sull'origine del

ceppo e sulle fonti di contaminazione di un determinato ambiente. Inoltre, i risultati ottenuti potrebbero servire ad associare un tipo di plasmide alla capacità di un ceppo di adattarsi ad un habitat diverso da quello intestinale e a fornire ulteriori informazioni sulla diffusione di famiglie di plasmidi antibiotico-resistenti tra le *Enterobacteriaceae* in differenti contesti.

BIBLIOGRAFIA

Antonelli G., Clementi M., Pozzi G., Rossolini G. M. (2012). Principi di microbiologia medica (Seconda edizione). Casa Editrice Ambrosiana.

Bandinelli M., Chezzi C., Dettori G., Manca N., Morace G., Polonelli L., Tufano M. A. (2006). Microbiologia medica – Batteriologia. Monduzzi editore.

Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D. G. J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 68-80.

Cao V., Lambert T., Nhu D. Q., Loan H. K., Hoang N. K., Arlet G., Courvalin P. (2002). Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3739-3743.

Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 2227-2238.

Citterio B., Andreoni F., Simoni S., Carloni E., Magnani M., Mangiaterra G., Cedraro N., Biavasco F., Vignaroli C. (2020). Plasmid replicon typing of antibiotic-resistant *Escherichia coli* from clams and marine sediments. *Frontiers in Microbiology* 11: 1101.

Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4555-4558.

Clermont O., Christenson J. K., Denamur E., Gordon D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5, 58-65.

Clermont O., Gordon D. M., Brisse S., Walk S. T., Denamur E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology* 13, 2468-2477.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. Wayne, PA: Technical report from the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Couturier M., Bex F., Bergquist P. L., Maas W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiology Reviews* 52, 375-395.

Croxen M. A., Finlay B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8, 26-38.

Datta N., Hedges R. W. (1971). Compatibility groups among *fⁱ* R factors. Nature 234, 222-223.

European Centre for Disease Prevention and Control (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC.

Frieri M., Kumar K., Boutin A. (2017). Antibiotic resistance. Journal of Infection and Public Health 10, 369-378.

García-Fernández A., Chiaretto G., Bertini A., Villa L., Fortini D., Ricci A., Carattoli A. (2008). Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 1229-1233.

Gautom R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. Journal of Clinical Microbiology 35, 2977-2980.

Gordon D. M. (2013). Chapter 1 – The ecology of *Escherichia coli* –
Donnenberg M. S. *Escherichia coli*. Pathotypes and Principles of Pathogenesis (Second Edition). pp. 3-20. Academic Press.

Hedges R. W., Datta N. (1971). *fⁱ* R factors giving chloramphenicol resistance. Nature 234, 220-221.

Hynes W. L., Ferretti J. J., Gilmore M. S., Segarra R. A. (1992). PCR amplification of streptococcal DNA using crude cell lysates. *FEMS Microbiology Letters* 94, 139-142.

Ishii S., Sadowsky M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments* 23, 101-108.

Jang J., Hur H.-G., Sadowsky M. J., Byappanahalli M. N., Yan T., Ishii S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology* 123, 570-581.

Jun L. J., Jeong J. B., Huh M., Chung J., Choi D., Lee C., Jeong H. (2004). Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture* 240, 89-100.

Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140.

Lambrecht E., Van Meervenne E., Boon N., Van de Wiele T., Wattiau P., Herman L., Heyndrickx M., Van Coillie E. (2018). Characterization of cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli*

originating from belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. *Microbial Drug Resistance* 24, 707-717.

Lapierre L., Cornejo J., Borie C., Toro C., San Martin B. (2008). Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microbial Drug Resistance* 14, 265-272.

Luna G. M., Vignaroli C., Rinaldi C., Pusceddu A., Nicoletti L., Gabellini M., Danovaro R., Biavasco F. (2010). Extraintestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5659-5668.

Martinez J. L., Coque T. M., Baquero F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology* 13, 116-123.

Mathers A. J., Peirano G., Pitout J. D. D. (2015). The Role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 565-591.

Mugnaioli C., Luzzaro F., De Luca F., Brigante G., Perilli M., Amicosante G., Stefani S., Toniolo A., Rossolini G. M. (2006). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging

countrywide problem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2700-2706.

Poirel L., Madec J.-Y., Lupo A., Schink A.-K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* 6(4):ARBA-0026-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

Pormohammad A., Nasiri M. J., Azimi T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance* 12, 1181-1197.

Rozwandowicz M., Brouwer M. S. M., Fischer J., Wagenaar J. A., Gonzalez-Zorn B., Guerra B., Mevius D. J., Hordijk J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73, 1121-1137.

Srinivasan V., Nam H. M., Sawant A. A., Headrick S. I., Nguyen L. T., Oliver S. P. (2008). Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microbial Ecology* 55, 184-193.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 8, 207-217.

Vignaroli C., Di Sante L., Leoni F., Chierichetti S., Ottaviani D., Citterio B., Biavasco F. (2016). Multidrug-resistant and epidemic clones of *Escherichia coli* from natural beds of Venus clam. *Food Microbiology* 59, 1-6.

Vignaroli C., Luna G. M., Pasquaroli S., Di Cesare A., Petruzzella R., Paroncini P., Biavasco F. (2013). Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach. *Environmental Science & Technology* 47, 13772-13780.

Walk S. T. (2015). The “Cryptic” *Escherichia*. *EcoSal Plus* 6(2). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2015

Walk S. T., Alm E. W., Calhoun L. M., Mladonicky J. M., Whittam T. S. (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology* 9, 2274-2288.

Walk S. T., Alm E. W., Gordon D. M., Ram J. L., Toranzos G. A., Tiedje J. M., Whittam T. S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6534-6544.

White A. P., Gibson D. L., Kim W., Kay W. W., Surette M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* 188, 3219-3227.

Whittam T. S., Ochman H., Selander R. K. (1983). Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution* 1, 67-83.

Xie M., Lin D., Chen K., Chan E. W., Yao W., Chen S. (2016). Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from retail meat that harbor *bla*_{CTX-M} and *fosA3* genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 2450-2455.

Zaman S., Hussain M., Nye R., et al. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* 9(6): e1403. DOI 10.7759/cureus.1403