



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale**

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

***Emergenza clinica di Enterobacter cloacae complex  
multiresistenti: caratterizzazione fenotipica ed epidemiologia  
genomica***

***Clinical emergency of multiresistant Enterobacter cloacae  
complex: phenotypical characterization and genomical  
epidemiology***

Tesi di Laurea Magistrale di:

Virginia Vichi

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Marina Mingoia

Sessione Straordinaria Febbraio 2023

Anno Accademico 2021/2022

# INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Genere <i>Enterobacter</i> .....	3
1.2. <i>Enterobacter cloacae</i> complex.....	5
1.3. Epidemiologia e diffusione globale.....	8
1.4. Aspetti clinici.....	9
1.5. Trattamento di prima linea .....	10
1.6. Meccanismi di Resistenza ai $\beta$ -lattamici.....	12
1.7. Scopo della ricerca .....	22
2. MATERIALI E METODI .....	26
2.1. Ceppi batterici.....	26
2.2. Caratterizzazione fenotipica.....	27
2.2.1 Test qualitativi di diffusione in agar.....	27
2.2.2. Test quantitativi per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).....	28
2.2.3. Test fenotipici per evidenziare le ESBL.....	30

2.2.4. Test fenotipici per evidenziare l'attività	
<i>carbapenemasi (mCIM)</i> .....	31
2.3. Tipizzazione molecolare.....	32
2.3.1. Estrazione del DNA totale.....	33
2.3.2. Elettroforesi su gel d'agarosio.....	34
2.3.3. PCR e PCR Multiplex.....	35
2.3.4. PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ).....	37
2.4. Sequenziamento .....	41
2.4.1 Estrazione del Dna Genomico.....	42
2.4.2. Qubit 4.....	42
2.4.3. Valutazione della qualità del DNA estratto.....	43
2.4.4. Nanopore.....	45
2.4.5. Flow cell.....	47
2.4.6. Rapid Barcoding Kit: Library per un solo campione.....	49
2.5. Esperimenti di Coniugazione.....	51
2.5.1. Coniugazione in brodo.....	52
2.5.2. Coniugazione su filtro.....	52

3. RISULTATI .....	54
3.1. <i>Sensibilità agli antibiotici</i> .....	54
3.2. <i>Saggi di amplificazione</i> .....	56
3.3. <i>Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE e S1-PFGE</i> .....	58
3.3. <i>Nanopore: analisi di sequenza</i> .....	59
3.3.1. <i>Multi Locus Sequence Typing (MLST)</i> .....	60
3.3.2. <i>ResFinder e PlasmidFinder</i> .....	61
3.4. <i>Assemblaggio ibrido: Nanopore e Illumina</i> .....	63
3.5. <i>Esperimenti di Coniugazione</i> .....	66
4. DISCUSSIONE.....	70
5. BIBLIOGRAFIA.....	76

# 1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo e l'uso degli antibiotici a partire dalla seconda metà del 1900 ha sicuramente portato un beneficio a livello mondiale, permettendo di trattare e/o prevenire le malattie causate da batteri, virus e parassiti emergenti; allo stesso tempo però ha causato la comparsa e l'incremento di antibiotico resistenze. Questa crescita sempre più esponenziale, dovuta principalmente all'uso inappropriato di farmaci a livello sia di medicina umana che veterinaria e alla maggior diffusione dei ceppi resistenti dovuto ad un aumento di viaggi e degli spostamenti internazionali, ha creato importanti problemi nella Sanità Pubblica a livello mondiale. Per questo motivo, negli ultimi decenni, sia l'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*) che l'UE (*Unione Europea*) hanno adottato delle misure per cercare di contenere questo fenomeno.

L'Italia, purtroppo, è da anni tra i paesi Europei con le più alte percentuali di resistenze verso le principali classi di antibiotici. A fronte di ciò, dal 2001, l'ISS (*Istituto Superiore della Sanità*) ha creato un sistema di sorveglianza dell'antibiotico resistenza (AR-ISS), formato da una serie di laboratori ospedalieri di microbiologia, con lo scopo di seguire l'andamento delle antibiotico-resistenze tra i patogeni nosocomiali più frequenti nei diversi Paesi (*Bellino, 2019*).

Alla luce di questa situazione e dei problemi che ne erano derivati, gli esperti hanno deciso di suddividere le varie specie di patogeni, in base ai loro meccanismi di resistenza, in tre gruppi di priorità: Critica, Alta e Media (WHO, 2017; Tacconelli, 2018).

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

**Tabella 1.** Classi di priorità (WHO, 2017).

Come si evince dalla **Tabella 1** alle diverse classi di priorità appartengono varie specie; uno sguardo più attento va sicuramente alla classe di priorità 1, ovvero a priorità **CRITICA**, che comprende i ceppi resistenti agli antibiotici *last resort* carbapenemi. In particolare, il gruppo I include, oltre alle due singole specie *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, tutti i ceppi appartenenti

alla famiglia *Enterobacteriaceae* resistenti contemporaneamente ai carbapenemi e alle cefalosporine di terza generazione.

I meccanismi di resistenza ai carbapenemi sono molteplici e comprendono lo sviluppo di enzimi capaci di idrolizzare specificatamente questi beta-lattamici, la modificazione dei sistemi di membrana (porine) e l'iperproduzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL). La produzione di carbapenemasi rimane il meccanismo più importante, sia perché si tratta di enzimi diversi per profilo di attività e di inibizione, sia perché i geni codificanti tali enzimi sono spesso collocati su elementi genetici mobili, quali trasposoni, integroni, plasmidi. Proprio le caratteristiche genetiche hanno contribuito alla diffusione della resistenza ai carbapenemi a livello mondiale. Rilevante è il ruolo di plasmidi auto trasmissibili ad un ampio spettro di specie (Nordmann, 2014).

### ***1.1. Genere Enterobacter***

Il genere *Enterobacter* appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende bacilli Gram-negativi (circa 0.6–1  $\mu\text{m}$  x 1.2–3.0  $\mu\text{m}$ ), anaerobi facoltativi, asporigeni, mobili per flagelli peritrichi (eccetto *Enterobacter asburiae*, che è immobile), talvolta capsulati. È stato descritto per la prima volta nel 1960, ma negli ultimi 50 anni si sono verificati cambiamenti nella tassonomia. Ad oggi, il genere *Enterobacter* comprende 22 specie, sette delle quali sono raggruppate all'interno del gruppo denominato *Enterobacter*

*cloacae* complex: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, ed *E. nimipressuralis*.

I batteri del genere *Enterobacter* sono associati a una varietà di habitat ambientali, si trovano nel suolo e nell'acqua e sono endofiti o considerati fitopatogeni per varie specie vegetali. Inoltre, è importante ricordare che *Enterobacter* spp. sono anche commensali naturali del microbiota intestinale animale e umano. Solo alcune specie/sottospecie sono state associate a infezioni ed epidemie acquisite in ospedale. Difatti, i ceppi *Enterobacter* spp. sono membri del gruppo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), che comprende i principali agenti eziologici causa di infezioni nosocomiali difficili da trattare. *E. aerogenes*, *E. cloacae* ed *E. hormaechei* che causano più frequentemente le infezioni ospedaliere, specialmente nei pazienti immunocompromessi e in quelli ricoverati nelle terapie intensive a causa dell'adattamento di queste specie agli agenti antimicrobici e del loro comportamento come patogeni opportunisti. Focolai ospedalieri sono stati segnalati in Europa fin dalla metà degli anni '90 e l'uso di antibiotici ad ampio spettro ha favorito la diffusione di cloni resistenti. Questi patogeni sono frequentemente associati a un fenotipo di multiresistenza ai farmaci (MDR), principalmente a causa del loro adattamento all'ambiente ospedaliero e della loro capacità di acquisire facilmente diversi elementi mobili



genetici contenenti geni di resistenza e virulenza. Queste specie hanno una resistenza intrinseca all'ampicillina, all'amoxicillina, alle cefalosporine di prima generazione e alla cefoxitina, dovuta all'espressione di una AmpC  $\beta$ -lattamasi naturale a codificazione cromosomica. Inoltre, in questi batteri è spesso stata segnalata la produzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso, che possono rendere difficile il trattamento delle infezioni.

## ***1.2. Enterobacter cloacae complex***

Le specie tradizionalmente incluse nel gruppo *Enterobacter cloacae complex* (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, ed *E. nimipressuralis*) sono genotipicamente molto vicine, e condividono oltre il 60% di omologia DNA-DNA (Davin-Regli, 2019). Studi filogenetici basati sulle sequenze di quattro geni *housekeeping* ha confermato la diversità genetica all'interno del *E. cloacae complex* (ECC), di cui tutte le specie affiliate, sebbene geneticamente correlate, formano cluster distinti. *E. cloacae* ed *E. hormaechei* sono i più frequentemente isolati nei campioni clinici umani. *E. cloacae* è la specie tipo del genere *Enterobacter*.

La sopravvivenza in diversi serbatoi e la dimostrazione di ceppi ECC in diverse fonti facilitano la colonizzazione dei pazienti, unitamente alla resistenza intrinseca all'ampicillina, all'amoxicillina-acido clavulanico e alla cefoxitina

grazie alla produzione di una cefalosporinasi naturale inducibile. La regolazione dell'espressione dell'enzima AmpC (derepressione e produzione costituiva in seguito a mutazione) può portare alla resistenza a un gran numero di  $\beta$ -lattamici, comprese le cefalosporine di terza generazione, eccetto il cefepime. Questa resistenza di tipo AmpC conferisce il 50% della resistenza ai  $\beta$ -lattamici nei ceppi clinici e coesiste frequentemente con quella dovuta all'espressione delle  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL). Intorno agli anni '90 sono stati identificati i primi casi di infezioni nosocomiali dovuti a ceppi portatori di ESBL, da allora varie ESBL, come TEM, SHV e CTX sono state caratterizzate in *E. cloacae*.

*E. cloacae* insieme ad *E. coli* e *K. pneumoniae*, è una delle più comuni Enterobacteriaceae resistenti alle cefalosporine di terza generazione; tuttavia, negli ultimi anni sono stati identificati isolati clinici resistenti ai carbapenemi, attraverso la produzione di carbapenemasi. In particolare, in Asia sono stati descritti ceppi che ospitano enzimi IMP, NDM, GIM o KPC. Il gruppo ECC presenta anche una resistenza variabile agli aminoglicosidi, grazie alla presenza di determinanti di resistenza a codificazione plasmidica. Per quanto riguarda i chinoloni, è stata osservata una resistenza, sempre di origine plasmidica, dovuta alla proteina QnrA, che è stata identificata in oltre il 60% dei ceppi.

*E. hormaechei* è principalmente isolato da campioni di origine umana. È sensibile o moderatamente sensibile a cefotaxime, ceftazidime, imipenem, gentamicina, tobramicina, amikacina e cloramfenicolo. Sebbene raramente, sono stati identificati ceppi con iperproduzione di ESBL e cefalosporinasi AmpC e recentemente ceppi produttori di carbapenemasi. Infine, in un recente studio di un focolaio nosocomiale ha dimostrato che molti ceppi sono risultati resistenti anche ai fluorochinoloni (Davin-Regli, 2019).

*E. asburiae* è stato descritto solo occasionalmente come batterio clinico significativo, principalmente nelle emocolture di pazienti sottoposti a trapianti di midollo osseo. Alcuni ceppi ambientali isolati da corsi d'acqua negli Stati Uniti hanno dimostrato di essere resistenti all'imipenem, grazie alla produzione di una carbapenemasi IMI-2 plasmidica (Davin-Regli, 2019).

*E. carcinogenus* è generalmente sensibile alle cefalosporine di terza generazione, imipenem, gentamicina, ciprofloxacina e colistina; mentre è naturalmente resistente alle aminopenicilline e ad alcune cefalosporine sempre per la produzione di una  $\beta$ -lattamasi AmpC cromosomica.

*E. kobei* ha tuttora un significato clinico incerto, i ceppi isolati dalle infezioni del tratto urinario sono risultate produrre ESBL. Anche *E. nimipressuralis* ha un ruolo incerto in ambito clinico.

*E. mori* è stato inizialmente descritto come un batterio fitopatogeno, probabilmente a causa della presenza di 66 geni coinvolti nei sistemi di secrezione. Gli studi della sequenza del rRNA 16S e la *Multilocus sequence analysis* (MLSA) hanno evidenziato che *E. mori* è strettamente correlato ad *E. asburiae*. Di recente, è stato identificato come il responsabile di infezioni umane in Austria: tutti gli isolati erano portatori di carbapenemasi IMI-2 (Davin-Regli, 2019).

### ***1.3. Epidemiologia e diffusione globale***

**Serbatoi ambientali.** I membri del genere *Enterobacter* sono organismi ambientali e patogeni opportunisti di piante ed essere umani. Si trovano in acque reflue, nel suolo, nelle piante e nelle feci animali. *E. cloacae* è stato isolato anche dal cibo come piante, verdure crude e radici, ma anche da acqua potabile; fu descritto anche da un focolaio ospedaliero di batteriemie, a causa della contaminazione di preparati per nutrizione parentale conservati in frigorifero. Sono stati descritti anche focolai dovuti a flaconi contaminati di albumina umana, umidificatori e apparecchiature per la terapia respiratoria e acqua per idroterapia.

**Serbatoi umani e infezioni correlate all'assistenza.** *E. asburiae* è stato isolato da urine, campioni respiratori, sangue, feci, infezioni cutanee e ferite. Anche la

specie tipo *E. cloacae* è spesso isolata in diversi campioni di origine clinica quali urine, espettorato e da emocoltura. È coinvolta nel 10% dei casi di peritonite postoperatoria, nel 5% delle sepsi nosocomiali e delle polmoniti e nel 4% delle infezioni del tratto urinario. Sono stati riportati casi di mieliti in pazienti neutropenici, endoftalmiti, ascesso cerebrale, meningite ed endocardite (Davin-Regli, 2019).

#### ***1.4. Aspetti clinici***

Poco si conosce sui fattori di patogenicità e virulenza di *Enterobacter spp.* a causa della scarsità di studi in questo settore. Oltre a facilitare la motilità, i flagelli possiedono diverse altre funzioni quali la formazione di biofilm, l'esportazione di proteine e l'adesione.

Oltre alle endotossine, i ceppi possono produrre enterotossine, emolisine, e citotossine simili alle tossine Shiga-like di tipo II. Un fattore di patogenicità importante nei batteri Gram-negativi è il sistema di secrezione di tipo III (TTSS) che è stato dimostrato nel 27% di isolati di *E. cloacae* da infezioni cliniche. *E. hormaechei* è considerato più virulento di altre specie a causa della presenza di un'isola di patogenicità (high-pathogenicity island, HPI) spesso identificata a livello del cromosoma. Altri ceppi del gruppo ECC possono ospitare geni codificanti fattori coinvolti nell'adesione ed invasione della

cellula ospite, nonché siderofori per chelare il ferro, indispensabile per il metabolismo batterico.

Le infezioni sostenute da *Enterobacter spp.* sono prevalentemente nosocomiali, soprattutto nelle terapie intensive e colpiscono pazienti immunocompromessi, come neonati, prematuri, pazienti con diabete mellito, ustionati, pazienti con leucemia o sottoposti a terapia immunosoppressiva. Le procedure invasive come il cateterismo e l'intubazione, frequenti nelle terapie intensive, rappresentano una delle principali fonti di infezione. Una lunga degenza in ospedale e un'esposizione prolungata ad antibiotici ad ampio spettro favorisce l'acquisizione di ceppi MDR, con un elevato rischio di mortalità (Davin-Regli, 2019).

### ***1.5. Trattamento di prima linea***

Siccome le infezioni dovute ad *Enterobacter spp.* sono principalmente acquisite in ambito nosocomiale, la maggior parte degli isolati presenta un'ampia resistenza a cefalosporine di terza generazione, penicilline e chinoloni, che rendono difficile il trattamento dei pazienti. Spesso i ceppi sono il risultato della selezione e della persistenza ospedaliera. Ciononostante, alcuni antibiotici rimangono efficaci per il trattamento: ad esempio, tra i  $\beta$ -lattamici, le cefalosporine di quarta generazione e i carbapenemi; gli aminoglicosidi

mantengono una buona attività. Al contrario, l'uso delle cefalosporine di terza generazione e dei monobattamici rappresenta un importante rischio di derepressione in vivo delle  $\beta$ -lattamasi Amp-C, che, come riportato in precedenza, può indurre un alto livello di resistenza a molti antibiotici  $\beta$ -lattamici (Davin-Regli, 2019). L'uso di cefalosporine di quarta generazione, quali il cefepime, sembra essere molto efficace nei confronti degli *Enterobacter* iperproduttori di AmpC. Rispetto alle cefalosporine più vecchie, queste molecole presentano un'efficiente diffusione attraverso le porine della membrana esterna, una significativa stabilità contro le  $\beta$ -lattamasi cromosomiche e una maggior affinità per le principali proteine leganti la penicillina (PBPs) situate nel periplasma. I carbapenemi sono molto efficaci; anche i ceppi *Enterobacter spp.* che iperproducono AmpC rimangono tipicamente suscettibili ad essi. Tuttavia, sebbene sia un meccanismo di resistenza raro, l'uso di carbapenemi può indurre perdita delle porine della membrana esterna portando ad un aumento dell'impermeabilità batterica. Una migliore strategia terapeutica è l'uso combinato di un antibiotico  $\beta$ -lattamico più inibitore: per esempio la combinazione piperacillina-tazobactam si è dimostrata essere una terapia efficace contro le infezioni da *Enterobacter*. Altrettanto valide sono le diverse combinazioni di cefalosporine e inibitori delle  $\beta$ -lattamasi (cefepime-zidebactam, cefepime-tazobactam, etc), sebbene il loro uso non sia incoraggiato come primo approccio terapeutico, al fine di limitare

l'emergenza di batteri resistenti a queste nuove soluzioni antibiotiche. Infine, gli aminoglicosidi, in particolare l'amikacina, rimangono molto attivi contro la maggior parte di *Enterobacter spp.*, in quanto la resistenza ad essi è solitamente dovuta alla presenza di geni plasmidici codificanti enzimi che modificano gli aminoglicosidi (Davin-Regli, 2019).

### ***1.6. Meccanismi di Resistenza ai $\beta$ -lattamici.***

I meccanismi di resistenza ai  $\beta$ -lattamici di *Enterobacter* ed in generale di tutte le *Enterobacteriaceae* sono diversi: 1) Inattivazione enzimatica mediante produzione di  $\beta$ -lattamasi, 2) Modificazione dei sistemi di trasporto in ingresso (porine) ed in uscita (pompe di efflusso), 3) Modificazione del bersaglio (*Penicillin Binding Proteins*).

La produzione di  $\beta$ -lattamasi è il principale meccanismo di resistenza ai  $\beta$ -lattamici. Oltre alle classiche penicillinasi e cefalosporinasi (attive nei confronti delle cefalosporine di I e II generazione), tutti gli *Enterobacter* hanno una produzione basale di una cefalosporinasi cromosomica AmpC che genera una resistenza alle cefalosporine più vecchie. Particolari condizioni, per esempio durante l'incubazione con concentrazioni subinibenti di carbapenemi, possono indurre l'iperproduzione di AmpC. L'acquisizione di altre cefalosporinasi AmpC-like a codificazione plasmidica o di ESBL, l'iperproduzione di AmpC



cromosomica in combinazione con modificazione dei sistemi di trasporto possono contribuire alla resistenza verso le cefalosporine di terza generazione.

Le prime infezioni acquisite in ospedale causate da ceppi resistenti ai comuni  $\beta$ -lattamici a causa dell'espressione di ESBL (TEM-24, CTX-M, etc.) sono state segnalate nel 1993 (Davin-Regli, 2019). Si tratta di enzimi spesso associati a plasmidi coniugativi di *Enterobacter* che contribuiscono ad allargare lo spettro della resistenza verso tutti i  $\beta$ -lattamici eccetto i carbapenemi e le cefalosporine di IV come il Cefepime.

Attualmente *E. cloacae* è identificato come la specie più comune resistente alle cefalosporine di terza generazione, dopo *E. coli* e *K. pneumoniae*. Le ESBL appartenenti alle classi TEM, SHV e CTX-M sono state caratterizzate in *E. cloacae*, inclusi enzimi TEM resistenti agli inibitori (IRT) (Davin-Regli, 2019).

La seconda strategia utilizzata dai batteri per resistere alla presenza degli antibiotici sono meccanismi associati alla membrana, ovvero modificazioni dei sistemi di trasporto, come per esempio le porine o le pompe di efflusso. In *Enterobacter spp.* sono state identificate tre porine generali Omp35, Omp36 e Omp37 e due ulteriori porine specifiche, LambB e PhoE; ciascuna porina è organizzata in trimeri stabili, ogni subunità contiene un canale idrofilo che presenta una tipica struttura a  $\beta$ -barile che attraverso una particolare organizzazione restringe il lume e crea un forte campo elettrico trasversale che

guida la diffusione della molecola carica. Questi canali consentono il trasporto degli antibiotici attraverso la membrana esterna, garantendone l'accumulo all'interno dello spazio periplasmatico; sicuramente rappresentano la prima barriera per controllare il flusso e la penetrazione e il livello di accumulo degli antimicrobici. Alla luce di ciò uno studio ha evidenziato che una modificazione/perdita di porine è dimostrabile in circa il 6-7% degli isolati di *E. aerogenes* resistente ai  $\beta$ -lattamici. Lo studio (Davin-Regli, 2019) ha riportato che, durante il trattamento antibiotico dei pazienti, era stata osservata un'alterazione sequenziale delle porine Omp35 e Omp36: da una normale espressione di entrambe le porine negli isolati sensibili ai carbapenemi, alla produzione di Omp36 e alla perdita di Omp35 nei ceppi con sensibilità intermedia fino alla resistenza ai carbapenemi dimostrata dai ceppi privi di entrambe le porine. Inoltre, la porina Lamb può essere espressa in sostituzione di Omp35 e Omp36, generando una bassa suscettibilità ai  $\beta$ -lattamici.

Diversi ceppi clinici di *E. cloacae* isolati da pazienti durante il trattamento antibiotico sono stati ampiamente studiati per quanto riguarda i loro livelli di espressione di porina e attività dei pori, evidenziando che la perdita delle porine si accompagna allo sviluppo della resistenza. È importante sottolineare che, oltre alla completa perdita di espressione, la resistenza agli antibiotici è associata ad una mutazione chiave, che impedisce la funzionalità delle porine. Si tratta infatti di una sostituzione amminoacidica (Glicina  $\rightarrow$  Acido aspartico)

a livello di una regione nel lume della Omp36, creando una modifica conformazionale tale da alterare la conduttanza e la selettività della proteina. Di conseguenza la porina promuove l'aumentata resistenza ai  $\beta$ -lattamici, ma conserva una limitata permeazione di nutrienti attraverso il canale. Questa strategia, che permette la sopravvivenza dei ceppi batterici in un ambiente reso selettivo da antibiotici, ha però un costo in termini di patogenicità, rendendo i batteri meno virulenti.

Le pompe di efflusso multifarmaco codificate da geni cromosomici di *Enterobacter* appartengono alle superfamiglie ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*Major facilitator superfamily*), SMR (*small-multidrug-resistant*), RND (*resistant-nodulation-cell-division*). Sono trasportatori localizzati sulla membrana interna (IM) e funzionano come monomeri o dimeri. Questi trasportatori IM pompano i farmaci dal citoplasma (o dal foglietto interno dell'IM) allo spazio periplasmatico; quindi, espellono efficacemente i composti antibatterici all'esterno della cellula batterica. Ad esempio, il complesso RND è un sistema di efflusso tripartito che comprende un trasportatore della membrana interna, una proteina adattatrice periplasmatica e un canale della membrana esterna. Queste pompe contribuiscono alla rimozione di un gran numero di composti chimicamente diversi, come antibiotici, detergenti, biocidi, conservanti che possono essere deleteri per i batteri. Il complesso più identificato e descritto negli isolati clinici di *E. cloacae* e *E. aerogenes* è la

pompa AcrAB-TolC. Infatti, in uno studio del 2008 è stata valutata l'attività di efflusso, misurata utilizzando un inibitore della pompa (PaβN) in isolati clinici raccolti nel periodo dal 1995 al 2003. L'espressione del complesso AcrAB-TolC è in grado di mantenere la concentrazione interna di antibiotici al di sotto della soglia necessaria per innescare la morte batterica.

Infine, per quanto riguarda l'alterazione/mutazione dei bersagli funzionali dei β-lattamici (PBP) si tratta di mutazioni che si verificano raramente in *Enterobacter* e che solitamente tale meccanismo è frammisto alla presenza di vari geni che codificano per ESBL o β-lattamasi di tipo AmpC plasmidiche.

Riassumendo, in *Enterobacter* la resistenza ai β-lattamici può essere esclusivamente dovuta ad un meccanismo di inattivazione enzimatica per produzione di β-lattamasi, oppure talvolta ad un insieme di meccanismi concomitanti, come alterazioni delle porine ed iperespressione di pompe di efflusso multifunzionali durante il trattamento antibiotico (Davin-Regli, 2019).

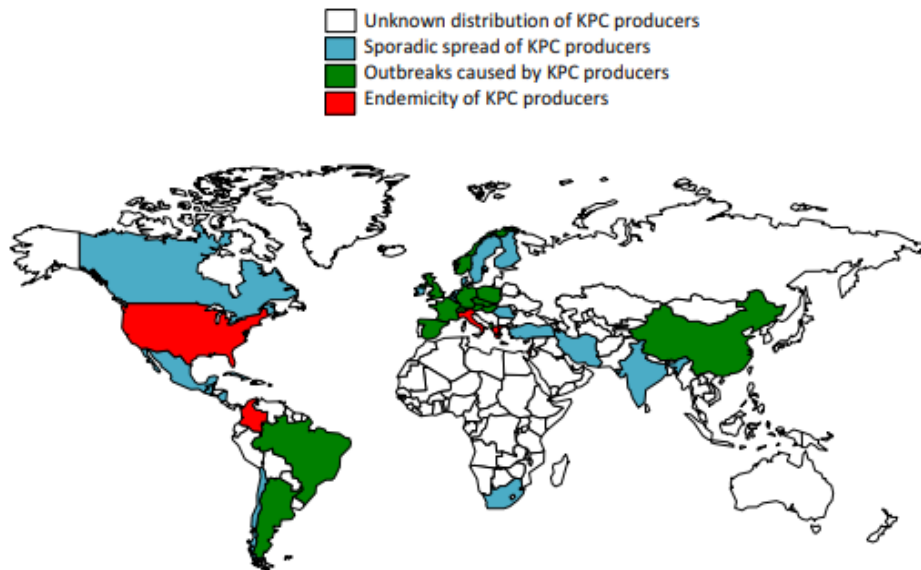
Un'attenzione particolare è da rivolgere alle carbapenemasi, che forniscono sicuramente il meccanismo di resistenza più importante ed efficace per due motivi principali: sono enzimi in grado di idrolizzare tutti o quasi tutti i β-lattamici e sono codificate da geni presenti su elementi genetici mobili facilmente trasmissibili.

Come tutte le  $\beta$ -lattamasi, anche gli enzimi carbapenemasi possono essere distinti in base alla classificazione molecolare di Ambler (*Bush, 2013*). In particolare, le principali classi di carbapenemasi finora identificate (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48) ricadono nelle classi di Ambler A, B e D (*Nordmann, 2014*).

Gli enzimi KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) sono attualmente gli enzimi clinicamente più significativi tra le carbapenemasi di classe A. Sono stati identificati principalmente nel patogeno nosocomiale *K. pneumoniae*, e conferiscono alti livelli di resistenza non solo ai carbapenemi ma anche alla maggior parte dei  $\beta$ -lattamici comprese le cefalosporine a spettro esteso e al cefepime. Dal primo ceppo di *K. pneumoniae* produttore di KPC-2, identificato nel 1996 negli Stati Uniti, sono state identificate molte varianti, anche se KPC-2 e KPC-3 rimangono quelle più comunemente riscontrate in *K. pneumoniae* ma anche in diverse altre *Enterobacteriaceae*. Uno specifico clone di *K. pneumoniae* (Clonal Group 258) produttore di KPC-2 o KPC-3 è stato ampiamente identificato in tutto il mondo.

In America Latina, i produttori di KPC sono endemici in alcune aree (Colombia, Argentina). Anche in Europa, ceppi KPC-produttori sono stati trovati quasi ovunque, con regioni endemiche (Grecia, Italia e Polonia) dove spesso si verificano epidemie nosocomiali sostenute quasi esclusivamente da

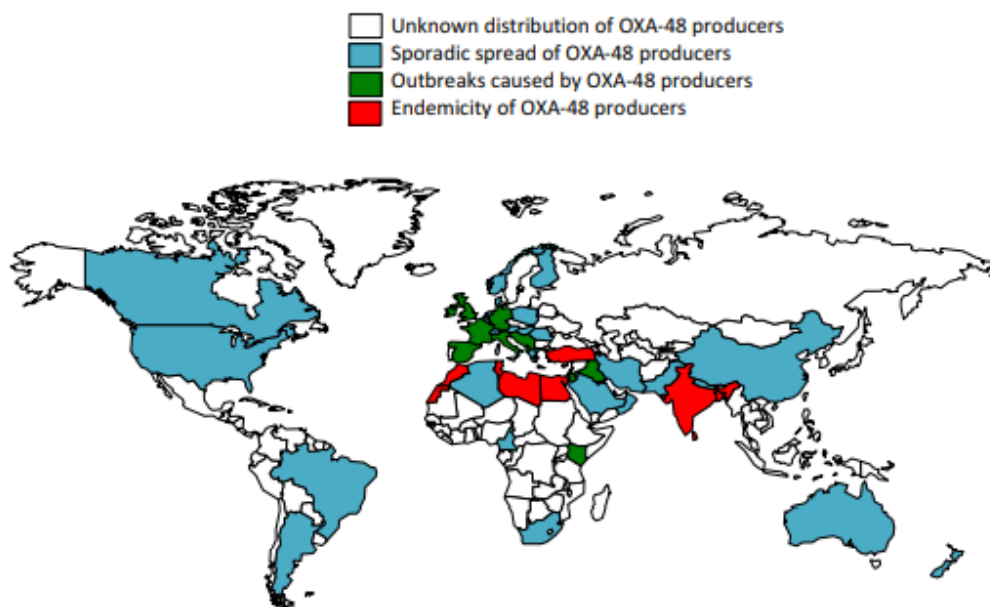
causate da *K. pneumoniae*. In India, la diffusione di KPC è più limitata, poiché le carbapenemasi più comunemente riscontrate sono NDM e gli enzimi OXA-48-like.



**Figura 1.** Distribuzione geografica dei produttori di KPC. (Nordmann, 2014)

Le  $\beta$ -lattamasi di classe D sono anche denominate OXA (“oxacillinasi”). Sono compresi più di 400 enzimi, ma solo alcune varianti possiedono attività carbapenemasi. Generalmente si tratta di  $\beta$ -lattamasi con attività verso le cefalosporine a spettro esteso ed una debole attività carbapenemasi, che non conferisce una resistenza di alto livello ai carbapenemi se non associata ad altri fattori quali l’impermeabilità di membrana. La maggior parte di questo tipo di carbapenemasi sono state identificate in *A. baumannii*. Tuttavia, l’enzima

OXA-48 e i suoi derivati sono stati largamente identificati nelle *Enterobacteriaceae*. Il primo ceppo OXA-48 di *K. pneumoniae* è stato isolato in Turchia nel 2003 e successivamente altri ceppi sono stati segnalati in epidemie nosocomiali in Turchia. Oggi gli isolati produttori di OXA-48 sono ampiamente diffusi in tutti i paesi europei, focolai ospedalieri che coinvolgono *K. pneumoniae*, *E. coli* ed *E. cloacae* produttori di OXA-48 sono stati segnalati in molti paesi come Francia, Germania, Svizzera e Regno Unito. Uno dei principali fattori che permettono il successo della diffusione del gene blaOXA-48 in una ampia varietà di specie di enterobatteri è l'elevata efficienza di trasferimento del plasmide che veicola blaOXA-48.



**Figura 2.** Distribuzione geografica dei produttori di OXA-48-like. (Nordmann, 2014)

Le metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) sono note per essere intrinseche in molte specie batteriche ambientali e opportunistiche, sono stati identificati come enzimi acquisiti dall'inizio degli anni '90 sia in *Pseudomonas* che in *Enterobacteriaceae* (Nordmann, 2014).

Le metallo- $\beta$ -lattamasi contengono tutte almeno un atomo di zinco nel sito attivo e sono facilmente inibite dai chelanti di ioni metallici (Bush, 2013). Le famiglie più comuni di MBL acquisite identificate nelle *Enterobacteriaceae* includono i gruppi VIM e IMP, insieme al gruppo emergente NDM, mentre altri, come GIM-1 e KHM-1 sono stati trovati solo sporadicamente. Sebbene siano stati segnalati in tutto il mondo, i produttori di VIM tra le *Enterobacteriaceae* sono altamente prevalenti nella parte meridionale dell'Europa e intorno al Mar Mediterraneo (segnalati per la prima volta in Italia), mentre i produttori di IMP rimangono per lo più localizzati in Asia. Le  $\beta$ -lattamasi di tipo IMP sono state le prime MBL ad essere identificate e sono state rilevate in Gram negativi clinicamente rilevanti di *Enterobacteriaceae*. IMP-1 è stata la prima ad essere identificata in *S. marcescens* in Giappone nel '91. Oggi sono presenti circa 48 varianti di IMP e i produttori di carbapenemasi di tipo IMP sono diffusi in tutto il mondo, sono molto meno frequenti rispetto

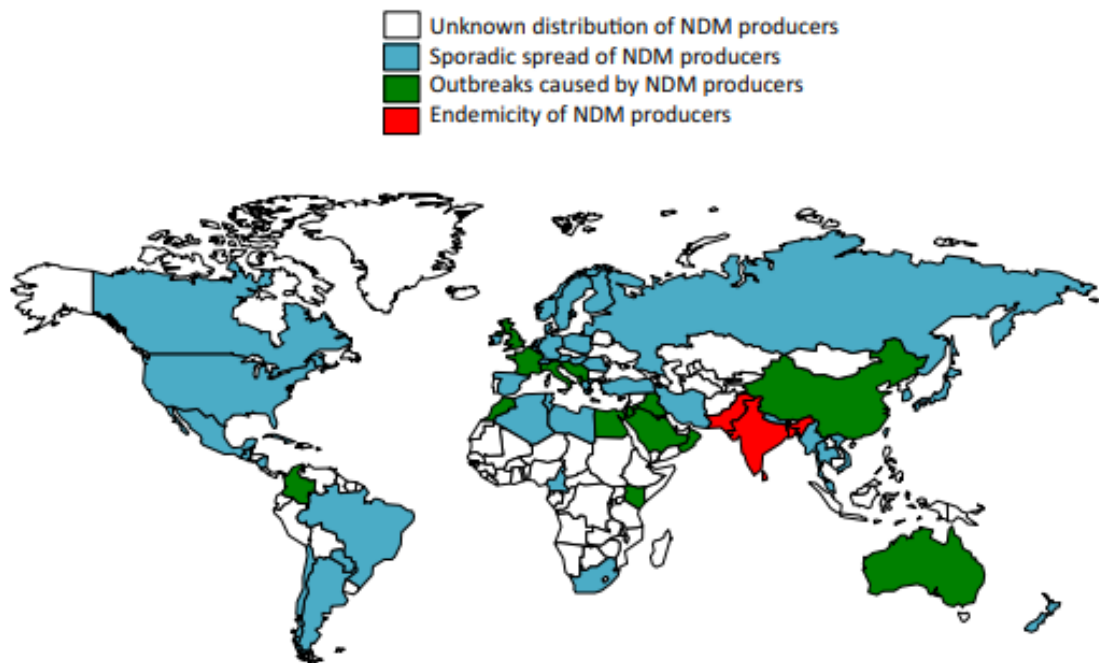


alle carbapenemasi di tipo VIM, NDM e delle altre classi; la prevalenza di IMP si concentra principalmente in Giappone e Cina Orientale.

La seconda carbapenemasi MBL identificata corrisponde agli enzimi di tipo VIM (*Verona Integron–encoded Metallo- $\beta$ -Lactamase*). VIM-1 è stato identificato in *P. aeruginosa* per la prima volta in Italia nel 1997 (Laurettil, 1999) e VIM-2 è stato poi riportato in Francia in un isolato sempre di *P. aeruginosa* risalente al 1996. Oggi la famiglia VIM comprende decine di varianti, che sono state identificate principalmente in *P. aeruginosa* ma anche in isolati di *Enterobacter*.

L'ultima carbapenemasi MBL clinicamente significativa è NDM (*New Delhi metallo- $\beta$ -lattamasi*), descritta nel 2009 in *K. pneumoniae* ed *E. coli* provenienti da un paziente svedese di origine indiana ricoverato in Svezia, dopo una degenza in ospedale a New Delhi. NDM-1 condivide pochissima identità con altri MBL, in quanto gli enzimi più simili sono VIM-1/VIM-2, con solo il 32,4% di identità amminoacidica. NDM idrolizza efficacemente un'ampia gamma di  $\beta$ -lattamici, comprese penicilline, cefalosporine e carbapenemi, al pari di tutte le MBL, ma risparmiando monobattami come l'aztreonam. La diffusione dei ceppi produttori di NDM, dapprima limitata al subcontinente indiano, gradualmente si è propagata anche in paesi Europei come il Regno Unito e la Francia; è stato ampiamente riportato l'impatto dei viaggi

intercontinentali come fonte di diffusione dei produttori di NDM (Nordmann, 2014).



*Figura 3. Distribuzione geografica dei produttori di NDM (Nordmann, 2014).*

### ***1.7. Scopo della ricerca***

Nell'ambito del gruppo di priorità critica (WHO, 2017) particolare importanza rivestono i batteri della famiglia *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi mediante la produzione di carbapenemasi (CP-CRE). Le infezioni sostenute da questi batteri, infatti, sono difficili da trattare e sono associate a prolungata ospedalizzazione ed elevati tassi di mortalità. La diffusione dei ceppi CP-CRE è favorita dal fatto che i geni codificanti le carbapenemasi sono spesso veicolati

da diversi tipi di plasmidi coniugativi che possono essere facilmente trasferiti da un ceppo all'altro e tra specie diverse della famiglia.

Data l'importanza a livello della Sanità pubblica mondiale, sono essenziali gli studi di sorveglianza che evidenziano la distribuzione e l'evoluzione dei diversi CP-CRE, a livello nazionale, sovranazionale e mondiale. Sebbene la famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprenda circa 50 generi riconosciuti, la sorveglianza per i CP-CRE è solitamente concentrata sugli organismi responsabili delle infezioni in ambito nosocomiale, principalmente *K. pneumoniae*, seguita da *E. coli* ed infine al terzo posto *Enterobacter spp.* (Maroya,2018).

Negli ultimi anni la prevalenza del complesso *Enterobacter cloacae* resistente ai carbapenemi (CREC) è aumentata in modo significativo. In CREC sono state identificate le diverse classi di carbapenemasi a serina (classe A e classe D) e le metallo- $\beta$ -lattamasi (classe B), sebbene la distribuzione dei ceppi differisca a livello geografico, per esempio i ceppi CREC produttori di KPC sono più frequenti in USA, mentre i ceppi CREC-NDM-1 prevalgono nel continente indiano (Annavaajhala,2019).

In Italia, sono state riportate diverse segnalazioni di ceppi CP-CRE produttori di VIM, con studi di sorveglianza che hanno evidenziato una diffusione minore rispetto ai ceppi che producono KPC. Di interesse è la recente segnalazione di

ceppi CREC multiresistenti VIM-produttori e resistenti alla colistina mediata dalla espressione dei geni *mcr* (Marchetti, 2021).

Anche in Francia, la diffusione di ceppi CREC è in aumento. Tra il 2012 e il 2014 gli isolati CREC sono stati la terza specie più comune tra i CP-CRE dopo *K. pneumoniae* ed *E. coli*. Le carbapenemasi nel primo studio di sorveglianza avevano la seguente distribuzione: OXA-48 (82%), VIM (7%), NDM (5%), IMI (2,5%), IMP(0,8%), KPC (0,8%). Uno studio successivo, relativo al periodo 2015-2018 ha mostrato un significativo aumento dei ceppi CREC produttori di carbapenemasi di tipo VIM (Emeraud, 2022). Il numero di CREC produttori di carbapenemasi è aumentato in maniera costante da 29 nel 2012 a 288 nel 2018; VIM era il secondo tipo di carbapenemasi più diffuso e nell'ultimo anno l'aumento di VIM rispetto alle altre carbapenemasi è stato molto più rapido. Il tasso di ceppi CREC VIM-positivi è aumentato dal 3,4% del 2012 al 24,7% del 2018, aumento che non è stato osservato in altre specie di *Enterobacterales* durante lo stesso periodo. Di conseguenza la prevalenza di CREC-VIM rispetto agli altri ceppi VIM-produttori *Enterobacterales* è aumentato drasticamente dal 6% nel 2012 al 52% nel 2018. La caratterizzazione molecolare dei ceppi CREC ha evidenziato una diversità di Sequence Types (ST) e di varianti VIM, suggerendo una non clonalità. Tra i 38 ST identificati (compresi 6 nuovi ST) prevalevano ST-873 (17,5%), ST-66

(12,1%), ST-78 (9,4%), ST-419 (8,1%). Inoltre, non è stato possibile rilevare una chiara correlazione tra ST e tipi di carbapenemasi VIM.

Considerando che anche in Italia è in corso un cambiamento nella distribuzione dei ceppi CP-CRE, delle classi di carbapenemasi e dei cloni ad “alto rischio” (Di Pilato, 2020), in questo studio è stata analizzata una collezione di ceppi appartenenti al gruppo *Enterobacter cloacae complex*, isolati da campioni clinici di pazienti ricoverati presso l’Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche nel periodo 2019-2022. La ricerca aveva come obiettivo caratterizzare i ceppi a livello fenotipico e genotipico, valutare la prevalenza dei ceppi resistenti ai carbapenemi e definire il tipo di carbapenemasi prodotta; inoltre, mediante indagini di tipizzazione e sequenziamento stabilire la relazione clonale tra i ceppi in esame e definire la circolazione di potenziali cloni ad “alto rischio”.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Ceppi batterici

Sono stati analizzati 10 ceppi batterici appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, provenienti dall’Azienda Ospedaliera “Ospedali Riuniti” di Ancona Torrette, isolati da materiale clinico nel periodo compreso tra 2019 e la prima metà del 2022. Tutti i ceppi sono stati identificati mediante MALDI-TOF ed appartenenti a *Enterobacter cloacae* complex (ECC) (**Tabella 2**).

Specie	ID ceppo	Campione clinico	Reparto	Anno di isolamento
ECC 1	526797	urine	Oncologia	2019
ECC 2	534096	Bile	Oncologia	2019
ECC 3	5541803	Urine	Nefrologia	2019
ECC 4	557644	Sangue	Emodialisi	2019
ECC 5	5691952	Sangue	Chirurgia	2019
ECC 6	611084	Sangue	Gastroenterologia	2020
ECC 7	665167	Sangue	Pronto Soccorso	2021
ECC 8	693563	Urine	Nefrodialisi	2021
ECC 9	695812/2	Urine da catetere	Neurochirurgia	2021
ECC 10	748301	Sangue	Emodialisi	2022

**Tabella 2.** Ceppi batterici analizzati nello studio

## ***2.2. Caratterizzazione fenotipica***

La determinazione del profilo di sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici in esame è stata condotta attraverso le seguenti procedure.

### ***2.2.1 Test qualitativi di diffusione in agar***

La valutazione qualitativa della sensibilità agli antibiotici è stata eseguita tramite il metodo di diffusione in agar, secondo le direttive dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

A partire da colture pure dei ceppi, cresciute overnight a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , si allestisce una sospensione in Mueller Hinton brodo (MHB) e si effettuano opportune diluizioni in modo da ottenere un inoculo standardizzato con densità ottica (O.D) 0.1 misurata ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 625 nm, che corrisponde a circa  $1 \times 10^8$  Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml). Con un tampone sterile si distribuisce in maniera uniforme l'inoculo sulla superficie di una piastra Mueller Hinton agar (MHA), si applicano sterilmente i dischetti degli antibiotici e si procede all'incubazione in ambiente aerobio a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 18-20 h (*EUCAST v\_12.0\_Breakpoint Tables*). Gli antibiotici saggiati e i valori di breakpoint sono riportati nella **Tabella 3**.

Antibiotico	Concentrazione Dischetto ( $\mu\text{g}$ )	Zone Diameter Breakpoint (mm)	
		S	R
Aztreonam (ATM)	30	$\geq 26$	$< 21$
Amikacina (AK)	30	$\geq 18$	$< 18$
Cloramfenicolo (CHL)	30	$\geq 17$	$< 17$
Ciprofloxacina (CIP)	5	$\geq 25$	$< 22$
Ertapenem (ETP)	10	$\geq 25$	$< 25$
Cefepime (FEP)	30	$\geq 27$	$< 24$
Gentamicina (GEN)	10	$\geq 17$	$< 17$
Imipenem (IMI)	10	$\geq 22$	$< 19$
Meropenem (MER)	10	$\geq 22$	$< 16$
Trimetoprim-Sulfametoxazolo (SXT)	1.25-23.5	$\geq 14$	$< 11$

*Tabella 3. Valori di riferimento per l'interpretazione dei diametri di inibizione dei ceppi.*

### ***2.2.2. Test quantitativi per la determinazione della Minima***

#### ***Concentrazione Inibente (MIC)***

La tecnica di microdiluzione in brodo (*EUCAST v\_12.0\_Breakpoint Tables*) è stata utilizzata per ottenere la Minima Concentrazione Inibente (MIC) dei ceppi in esame ai seguenti antibiotici: Imipenem (IMI), Meropenem (MER), Ertapenem (ETP), Ciprofloxacina (CIP), Amikacina (AK), Gentamicina (GEN), Colistina (COL) e Tigeciclina (TGC). Gli antibiotici in polvere (Sigma-Aldrich Co, Milano) sono stati risospesi in adeguati solventi ad una concentrazione di 10 mg/ml e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso.



Opportune diluizioni scalari in MHB delle soluzioni stock di antibiotico sono state cimentate con una concentrazione fissa di inoculo standardizzato dei ceppi da esaminare pari a  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $18 \pm 2$ h. Il ceppo di *E. coli* ATCC 25922 è stato utilizzato in tutti gli esperimenti come controllo di qualità.

Il valore della minima concentrazione inibente (MIC) è dato dalla più bassa concentrazione di antibiotico in cui non è visibile la crescita batterica. Per l'interpretazione dei risultati ci si avvale delle tabelle (**Tabella 4** di riferimento fornita dal comitato EUCAST per *Enterobacterales* e **Tabella 5** di riferimento fornita dalla Food and Drug Administration per *Enterobacterales*).

Antibiotico	MIC breakpoints (mg/L)	
	S	R
Amikacina (AK)	$\leq 8$	$> 8$
Ciprofloxacina (CIP)	$\leq 0,25$	$> 0,5$
Ertapenem (ETP)	$\leq 0,5$	$> 0,5$
Gentamicina (GEN)	$\leq 2$	$> 2$
Imipenem (IMI)	$\leq 2$	$> 4$
Meropenem (MER)	$\leq 2$	$> 8$
Colistina (COL)	$\leq 2$	$> 2$

**Tabella 4.** Valori di riferimento per l'interpretazione dei valori di MIC per *Enterobacterales*

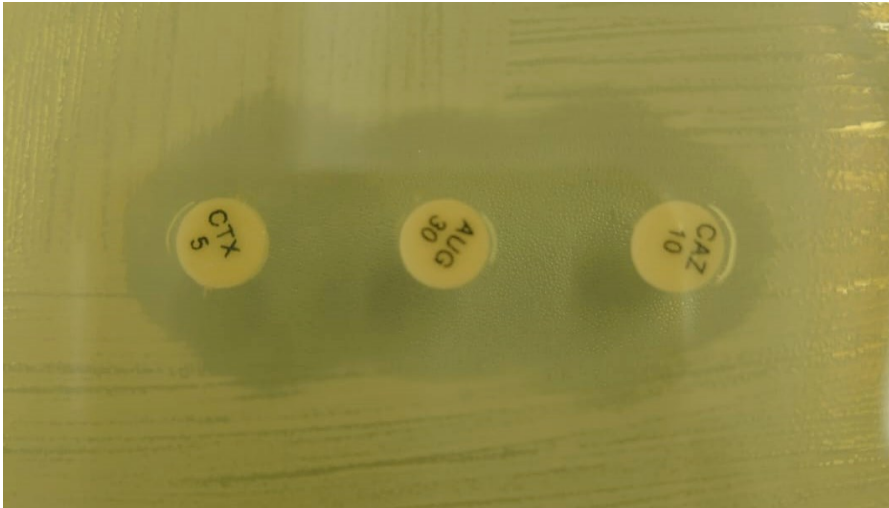
Antibiotico	MIC breakpoints (mg/L)		
	S	I	R
Tigeciclina (TGC) *	≤2	4	>8

**Tabella 5.** Valori di riferimento Food and Drug Administration (FDA) per l'interpretazione dei valori di MIC per Enterobacterales

Per tutti i ceppi è stata inoltre valutata la MIC di ETP in presenza del beta-lattamico Cloxacillina (200 µg/ml), che rappresenta un inibitore specifico di alcuni enzimi di beta-lattamasi di classe C. Un aumento di 4 X il valore di MIC di ETP-CLOXA rispetto a ETP da solo è stato considerato positivo.

### **2.2.3. Test fenotipici per evidenziare le ESBL**

Per mettere in evidenza le ESBL (β-lattamasi a spettro esteso) di classe A nei ceppi di interesse è stata utilizzata la procedura di diffusione in agar. Il dischetto di Amoxicillina + Acido clavulanico (AUG) è stato posto tra i dischetti di Cefotaxime (CTX) e Ceftazidime (CAZ) ad una distanza di 12-16 mm dai rispettivi bordi. Il test fenotipico si basa sul principio di inibizione dell'attività enzimatica delle ESBL da parte dell'acido clavulanico e si evidenzia da un aumento dell'alone di inibizione delle cefalosporine a spettro esteso CTX e CAZ in corrispondenza di AUG (**Figura 4**).



*Figura 4. Risultato positivo per il test per evidenziare le ESBL*

#### ***2.2.4. Test fenotipici per evidenziare l'attività carbapenemasi***

##### ***(mCIM)***

Per documentare la presenza di un'attività carbapenemasi è stato utilizzato il metodo mCIM (*modified Carbapenem Inactivation Method*) secondo la letteratura di riferimento (*Pierce, 2017*). In breve, aliquote (1  $\mu$ l) del ceppo da testare sono sospese in 2 ml di Tryptic Soy Broth (TSB); la sospensione batterica ottenuta va agitata al vortex per 15-20 sec, dopodiché si aggiunge sterilmente un dischetto di meropenem (MEM) da 10  $\mu$ g e si pone in incubazione per 4 h  $\pm$  15 min a 35°C  $\pm$  2°C. Poco prima del termine del tempo di incubazione stabilito per l'inattivazione del carbapenemico, viene preparata una sospensione 0.5 McFarland del ceppo indicatore (*Escherichia coli* ATCC 25922), da distribuire in modo uniforme sulla superficie di piastre MHA.

Al termine delle 4 h, il dischetto di MEM viene rimosso dalla sospensione batterica in TSB mediante un'ansa da inoculo da 10 µl; in particolare l'ansa viene trascinata lungo il bordo della provetta durante la rimozione, in modo da eliminare l'eccesso di liquido. Si posiziona il dischetto di MEM sulla piastra di MHA preparata con il ceppo reporter e si procede all'incubazione per 18-24 h a 35°C ± 2°C.

L'interpretazione del test consiste nel valutare i diametri degli aloni di inibizione del ceppo reporter ATCC 25922 nei confronti dei dischetti di MEM precedentemente incubati con i ceppi in esame sospettati di produrre carbapenemasi (**Tabella 6** Interpretazione risultati mCIM) (Pierce, 2017).

mCIM zone diameter	mCIM result
6-15 mm	Positivo
16-18mm	Intermedio
≥19mm	Negativo

*Tabella 6. Interpretazione risultati mCIM.*

### **2.3. Tipizzazione molecolare**

La caratterizzazione genotipica attraverso tecniche di amplificazione (**PCR e PCR Multiplex**) ci hanno permesso di determinare la presenza di geni di resistenza e geni funzionali. Inoltre, è stata utilizzata la tecnica di tipizzazione RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e PFGE per confrontare i

profili genomici dei ceppi (**XbaI PFGE**) e visualizzare la presenza di plasmidi (**S1 PFGE**).

### ***2.3.1. Estrazione del DNA totale***

Il DNA dei ceppi in esame è stato estratto utilizzando il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich).

Aliquote di colture cresciute overnight a 37°C sono state centrifugate per 2 minuti a 12000 g ed il pellet ottenuto è stato sospeso in 180 µl di *Lysis Solution T* con aggiunta di 20 µl di *RNasi A solution* (per degradare il contenuto di RNA). Dopo aver atteso 2 minuti a temperatura ambiente, si aggiunge 20 µl di *Proteinasi K* (20 mg/ml) per la rottura delle membrane cellulari. Dopo aver incubato a 55°C per 30 min, si procede con l'aggiunta di 200 µl di *Lysis Solution C*, mescolando al vortex per 15 s e si lascia infine incubare per 10 minuti a 55°C. Al lisato sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 95% per far precipitare il DNA. La colonnina di purificazione fornita dal kit è stata preparata con l'aggiunta di 500 µl di *Column preparation Solution* e successiva centrifugazione a 12000 g per 1 minuto. Il DNA da purificare viene aggiunto alla colonnina e si centrifuga per 1 minuto a 6500 g, quindi si eseguono due lavaggi, dapprima con 500 µl di *Wash Solution 1* seguito da centrifugazione per 1 minuto a 6500 g ed il secondo con *Wash Solution Concentrate*

centrifugando per 3 minuti a 12000 g. Al termine dei lavaggi si trasferisce la colonnina in una nuova eppendorf da 2 ml. Per la fase finale di eluizione si aggiungono 200  $\mu$ l di *Elution Solution* oppure acqua MilliQ sterile preriscaldata a 60°C, si mantiene 5 minuti a temperatura ambiente ed infine si centrifuga per 1 minuto a 12000 g. La colonnina viene scartata e il DNA genomico purificato viene conservato a -20°C.

### ***2.3.2. Elettroforesi su gel d'agarosio***

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare le molecole di acido nucleico in base al loro peso molecolare, sfruttando l'azione di un campo elettrico creato dalla presenza di un anodo e un catodo ai lati dell'apparecchiatura. Le molecole di acido nucleico sono cariche negativamente e migrano verso il polo positivo (anodo) ad una velocità variabile che è inversamente proporzionale alla loro dimensione. La separazione è possibile grazie al setaccio molecolare creato da una matrice di agarosio. I frammenti una volta separati vengono visualizzati attraverso l'uso di intercalanti fluorescenti del DNA. Per visualizzare la grandezza dei frammenti amplificati viene utilizzato un marker con dimensioni molecolari note (100 bp, 100 bp Plus, 1 kb, ditta Thermo Scientific).

L'elettroforesi è stata svolta su un gel d'agarosio (Agarose D-1 LE Standard for Molecular Biology- Fisher Molecular Biology) a concentrazioni variabili (1-2%) in TAE (Tris, Acetato ed EDTA) 1X, a seconda di quanto è richiesto dai protocolli, ed aggiungendo 300 µl di Green Gel (Società Italiani Chimici) come intercalante fluorescente. L'elettroforesi è stata condotta ad un voltaggio costante di 80-90V per circa 30/40 minuti. Al termine della corsa il gel è stato visualizzato al trans illuminatore UV.

### ***2.3.3. PCR e PCR Multiplex***

La procedura di amplificazione PCR (*Polymerase Chain Reaction*) si basa sull'alternarsi di tre 3 fasi, ***denaturazione, annealing e polimerizzazione***, per un certo numero di cicli, a tre temperature differenti, tutto questo viene svolto in maniera automatica attraverso uno strumento, che nel nostro laboratorio è il termociclatore. In questo studio è stata utilizzata per la ricerca di geni codificanti le principali carbapenemasi (KPC, OXA-48, NDM, IMP e VIM) utilizzando primer e procedure presenti in letteratura (*Poirel, 2011*) (**Tabella 7**); geni codificanti le principali β-lattamasi di classe A (TEM, SHV, OXA) sempre in accordo con la letteratura (*Dallenne, 2010*) (**Tabella 7**); geni funzionali e di resistenza degli integroni di classe 1 con primer di letteratura (*Poirel, 2001*) (**Tabella 8**) e di nostra produzione. In tutte le reazioni di

amplificazione è stata utilizzata l'enzima DreamTaq (ThermoFisher) e in qualche caso l'enzima ExTaq se il prodotto di amplificazione eccedeva le 3 kb (EX Taq Takara).

<b>GENE</b>	<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZA (5'-3')</b>	<b>DIMENSIONE (bp)</b>
TEM	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	800bp
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV	MultiTSO-T_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713bp
	MultiTSO-T_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
OXA-1	MultiTSO-T_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564bp
	MultiTSO-T_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
KPC	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893bp
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
VIM	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	438bp
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
NDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621bp
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
OXA-48	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438bp
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	
IMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232bp
	IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	

**Tabella 7.** Primer di geni di resistenza utilizzati. (Poirel 2011 e Dallenne 2010)



<b>GENE</b>	<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZA (5'-3')</b>	<b>DIMENSIONE (bp)</b>
<i>intI1</i>	CS-INT2 F	TCTCGGGTAACATCAAGG	
5'-CS	class 1 F	GGCATCCAAGCAGCAAG	
3'-CS	class 1 R	AAGCAGACTTGACCTGA	
<i>sul1</i>	sul1-F	ATGGTGACGGTGTTCGGCA	823bp
	sul1-R	CTCGGTCTCTGGCGTCGC	
<i>aac6-Ib</i>	aac6-Ib-F	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482bp
	aac6-Ib- R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>aadA1</i>	aadA1-F	TCAGAGGTAGTTGGCGTC	752bp
	aadA1-R	TATTTGCCGACTACCTTGGT	
<i>catB2</i>	catB2-F	GCAGGTGAAGAATCCGAAC	548bp
	catB2-R	CAATGCCAGACGAACAAAG	

**Tabella 8.** Primer usati per lo studio dell'integrone classe 1 (Poirel, 2001)

### **2.3.4. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

La PFGE è una tecnica particolare di elettroforesi che permette di separare dei frammenti di DNA di maggiore dimensione (10-800kb), rispetto a all'elettroforesi a campo continuo, ottenuti grazie all'utilizzo di enzimi di restrizione che tagliano infrequentemente il DNA.

La separazione delle grandi molecole di DNA viene risolta applicando un campo elettrico che cambia periodicamente direzione secondo tempi predeterminati e con un angolo incluso di 120°.

Ci siamo attenuti al protocollo di letteratura (*Hunter, 2005*; <https://pulsenetinternational.org/protocols/pfge/>), apportando qualche modifica: (1) Low Melt Agarose all'1,6% invece che all'1% come da protocollo; (2) aggiunta di Proteinase K dopo la solidificazione delle plug. Dopo incubazione overnight a 37°C, i campioni sono stati sospesi in 2 ml di Suspension Buffer (SB) (TRIS-HCl 0,1 M + EDTA 0,1 M) e diluiti fino ad ottenere una densità ottica di 0,8 O.D. (range 0,570-0,820) ad una lunghezza d'onda di 610 nm ( $\lambda$ ). 400  $\mu$ l di questa sospensione sono state omogeneamente mescolate con ugual volume di Agarosio Low Melt al 1,6% [ 91,6% di Agar e 1% di SDS (sodio dodecilsolfato)] mantenuto fuso e successivamente distribuito in appositi stampi *plug molds*. La solidificazione è stata accelerata ponendo i supporti a 4°C.

In seguito, si procede trasferendo le plug in provette contenenti 5 ml di Lysis Buffer e 25  $\mu$ l di Proteinasi K per permettere la lisi cellulare e la fuoriuscita del DNA, si lascia incubare per 2h a 54°C a bagnomaria in agitazione.

Al termine delle 2h si effettuano 6 lavaggi totali in volumi di 5 ml, i primi due con acqua sterile ultrapura e gli altri 4 con TE buffer (TRIS-HCl 10mM +

EDTA 1mM) entrambi pre-riscaldati a bagnomaria a 55°C. Dopo l'ultimo lavaggio con TE, si aggiungono 5 ml di TE a temperatura ambiente e si mantengono le plug in frigorifero a 4°C.

Per la digestione enzimatica sono stati utilizzati due enzimi XbaI e S1. XbaI è un enzima di restrizione che taglia infrequentemente il DNA dei batteri Gram negativi e permette di visualizzare e confrontare i profili dei vari ceppi in esame. L'enzima S1 è una nucleasi, prodotta da *Aspergillus oryzae*, che consente di evidenziare il numero di plasmidi in un determinato ceppo batterico.

La digestione viene condotta con 40 U di XbaI a 37°C per 2 h, mentre con S1, 75U per 30 minuti a temperatura ambiente; per bloccare la digestione enzimatica si aggiungono 500 µl di EDTA (0,1M, pH=8) e si lascia agire per 10 minuti.

Le plug digerite vengono caricate opportunamente sul pettine unitamente ad un marker specifico utilizzando una piccola quantità di Low melt Agarose preriscaldato; i marker che sono stati utilizzati sono: ***Lambda PFG Ladder*** (Size range: 48.5 - 1,018 kb, New England Biolabs) per XbaI e ***MidRange PFG Marker*** (Size range: 15–291 kb, New England Biolabs) per S1.

Una volta pronto, il gel viene caricato nell'apparecchiatura per la PFGE, Chef Mapper XA System (Biorad), e sottoposto a corsa elettroforetica in TBE 0,5X (Tris Borato EDTA ) secondo le seguenti condizioni:

<i>Parametri</i>	<i>XbaI</i>	<i>S1</i>
<i>Run time</i>	22 ore	18 ore
<i>Field Angle</i>	120°	120°
<i>Initial Switch Time</i>	2,2 secondi	0,5 secondi
<i>Final Switch Time</i>	54,2 secondi	20 secondi
<i>Ramping Factor</i>	lineare	lineare
<i>Gradient</i>	6 V/cm	6 V/cm
<i>Temperature</i>	14°C	14°C

**Tabella 9.** Parametri utilizzati

Al termine della corsa elettroforetica, si effettua la visualizzazione delle bande al transilluminatore UV, dopo aver colorato il gel in Bromuro d'Etidio (0,5 µg/ml) per almeno 30 minuti.

L'interpretazione dei profili PFGE ottenuti viene eseguita seguendo i criteri di letteratura (Tenover, 1995) (**Tabella 10**). Quando i profili di restrizione non differiscono per nessuna banda si definiscono “indistinguibili”, se differiscono per 1 banda si tratta di ceppi “strettamente correlati”, se invece si distinguono

per due si tratta di ceppi “possibilmente correlati”, con più o uguale tre bande i ceppi sono “differenti”.

TABLE 2. Criteria for interpreting PFGE patterns

Category	No. of genetic differences compared with outbreak strain	Typical no. of fragment differences compared with outbreak pattern	Epidemiologic interpretation
Indistinguishable	0	0	Isolate is part of the outbreak
Closely related	1	2–3	Isolate is probably part of the outbreak
Possibly related	2	4–6	Isolate is possibly part of the outbreak
Different	≥3	≥7	Isolate is not part of the outbreak

*Tabella 10. Criteri per l'interpretazione dei profili PFGE. (Tenover et al., 1995)*

## 2.4. Sequenziamento

Il sequenziamento è una tecnica che consente di risalire alla sequenza delle basi che compongono un determinato segmento di DNA (Goodwin, 2016). Nel nostro laboratorio disponiamo di due strumenti di nuova generazione per il sequenziamento, uno di seconda generazione, **Sistema Illumina MiSeq™** che permette di ottenere delle reads di 50-250 bp, in un arco di tempo che può richiedere fino a circa 6 giorni a seconda della lunghezza del filamento da sequenziare (Polanco, 2021) ; e un sistema di terza generazione, **Nanopore**,

che mi permette di ottenere delle reads con lunghezza nell'ordine delle megabasi (Mb) in tempi decisamente più rapidi (*Valeri, 2021*).

### ***2.4.1 Estrazione del Dna Genomico***

Il DNA è stato estratto con kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich), secondo la procedura descritta in precedenza (cap. 2.3.1).

### ***2.4.2. Qubit 4***

In seguito ad estrazione si procede con la quantificazione del DNA ottenuto mediante il fluorimetro Qubit 4 (Invitrogen) che permette una rapida e sensibile quantificazione degli acidi nucleici (DNA, RNA) e delle proteine.

Per la quantificazione dei campioni occorre preparare una miscela di DNA appena estratto e di *Working Solution*, in quantità rispettivamente di 2  $\mu$ l e 198  $\mu$ l, per un volume totale di 200  $\mu$ l. La *Working Solution* è una soluzione costituita da buffer e fluorofori e deve essere conservata in frigo.

Una volta preparata la miscela, occorre vortexare bene e attendere 2 minuti a temperatura ambiente prima di inserire il campione nel fluorimetro. Lo strumento esegue la lettura e fornisce una misura della quantità di DNA presente nel campione in ng/ $\mu$ l.

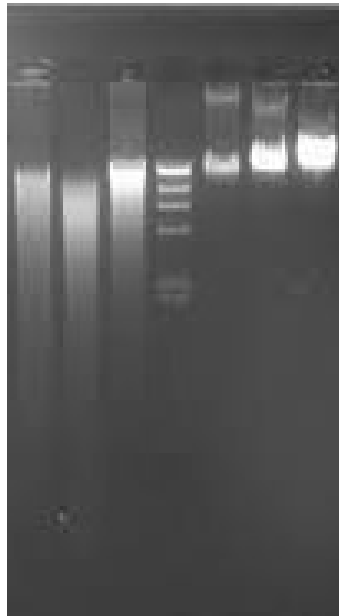


*Figura 5. Qubit4*

### ***2.4.3. Valutazione della qualità del DNA estratto***

Dopo aver estratto e quantificato il DNA è necessario verificare che il DNA dei ceppi in esame sia di buona qualità e non eccessivamente frammentato. Questo *step* è necessario soprattutto per il sequenziamento mediante la piattaforma Nanopore.

Per valutare la qualità dell'estrazione, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% . Al termine della corsa elettroforetica, si visualizza il gel al trans illuminatore UV. Se l'impronta lasciata sul gel è uno "Smear", ovvero una striscia continua e diffusa, significa che il DNA è estremamente frammentato e che il campione è di scarsa qualità. UN campione di buona qualità è indicato dalla presenza di una banda netta nella parte alta del gel (**Figura 6**).



**Figura 6.** *A sinistra del marker campioni di DNA degradato; a destra sono presenti campioni di DNA di buona qualità a concentrazioni crescenti.*



#### **2.4.4. Nanopore**

I ceppi sono stati sequenziati mediante una delle ultime tecnologie di *Next Generations Sequencing* (NGS) usando lo strumento *Oxford Nanopore MinION Mk1B*.

La tecnologia Nanopore si basa sull'uso di nanopori inseriti in una membrana elettro-resistente, attraversata da una corrente ionica. Quando una molecola di acido nucleico (DNA o RNA) passa attraverso il poro, si produce una specifica alterazione del flusso di corrente in base ai nucleotidi presenti nel poro. Un software di *basecalling* converte la variazione di corrente nella relativa sequenza nucleotidica. La procedura non necessita dell'amplificazione di DNA ma solo di un estratto di qualità e della preparazione di una libreria. I vantaggi sono la produzione di *reads* molto lunghe (oltre 4 Mb) e di uno strumento di grande maneggevolezza che occupa veramente poco spazio (105 x 33 x 23 mm). Il MinION può essere facilmente collegato al computer tramite una porta USB 3.0 e gestito mediante il software MinKNOW.

I dispositivi di sequenziamento Oxford Nanopore si basano sull'utilizzo di una *Flow Cell* contenente una membrana dove sono alloggiati i nanopori. Dopo aver caricato la library all'interno della flow cell, viene applicato un voltaggio

preciso. Ogni volta che un nucleotide attraversa la membrana, viene registrata una specifica variazione nell'intensità di corrente elettrica.



**Figura 7.** MinION

Al termine del sequenziamento viene effettuato il *basecalling*, ovvero ciascun segnale elettrico viene convertito nella corrispondente base. Le *reads* ottenute sono disponibili in formato fast5 e FASTQ. Il programma MinKNOW consente di monitorare la corsa e di valutare l'accuratezza del *basecalling* grazie all'assegnazione di un punteggio indicato come QualityScore. L'assemblaggio delle *reads* è stato eseguito mediante il software Canu (<https://github.com/marbl/canu>) ed i risultati sono stati analizzati tramite diversi software online per l'analisi bioinformatica (<https://www.genomicepidemiology.org/>).

### **2.4.5. Flow cell**

Le flow cell utilizzate hanno una dimensione standard di 92.4 mm x 28.0 mm x 5.8 mm. Le flow cell possiedono 512 canali, ognuno in grado di sequenziare frammenti di DNA indipendenti. Ogni canale contiene 4 nanopori, per un totale di circa 2048 nanopori disposti in maniera esagonale sulla superficie dell'array.

La flow cell è costituita da diversi elementi: la **priming port**, la **SpotON port**, che permette di caricare la libreria direttamente sopra la matrice dei sensori (**sensor array**) un canale (capacità massima pari a 2 ml) e una **waste port** per eliminare il buffer e il materiale di scarto in eccesso. Inoltre, sono presenti due valvole incaricate di regolare il flusso dei liquidi attraverso la flow cell (**Figura 8**).

Le flow cell vengono consegnate con lo *storage buffer* all'interno dei canali, si tratta di un liquido di conservazione che permette di mantenere l'equilibrio osmotico all'interno della cella ed è costituito da sali e da una coppia redox che consente alla corrente elettrica di fluire attraverso il nanopore. Una flow cell integra può essere conservata in frigorifero, ad una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 gradi, per un massimo di 3 mesi mentre, a temperatura ambiente, solo per 30 giorni. Prima di iniziare l'esperimento, il buffer viene rimosso tramite aspirazione con pipetta dalla *priming port* e sostituito con il *Flash Buffer (FB)*.

I campioni (massimo 100  $\mu$ l) vengono inoculati direttamente nell'array tramite la SpotON port.

È possibile sequenziare contemporaneamente fino a 12 campioni, identificabili grazie ad un precedente processo di *barcoding*; si tratta di un “codice identificativo” che lega ciascuna sequenza di DNA permettendone il riconoscimento durante e al termine del sequenziamento.

Il protocollo completo da seguire per poter preparare adeguatamente la cella, il FB e la libreria di DNA dei campioni, è consultabile sul sito Oxford Nanopore Technologies (<https://nanoporetech.com/>).



**Figura 8.** Principali componenti della Flow cell

#### ***2.4.6. Rapid Barcoding Kit: Library per un solo campione***

Il kit utilizzato per il sequenziamento è il Rapid Sequencing kit (SQK-RAD004). Questo kit contiene:

- FRA: Fragmentation mix (con trasposasi e adattatori delle trasposasi)

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

- LB: Loading beads

- SQB: Sequencing buffer

- Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002) per utilizzare: *Flush Buffer (FB)* ed il *Flush Tether (FLT)*.

Per la preparazione della libreria si procede scongelando FRA, RAP, SQB, LB, FB, FLT che devono essere mantenuti in ghiaccio durante la procedura. Successivamente viene preparata una provetta da PCR con 7,5 µl di DNA (precedentemente diluito in modo da avere almeno 400 ng di DNA) e 2,5 µl di FRA. La provetta contenente la soluzione ben miscelata viene inserita nel termociclatore per permettere la frammentazione (1 minuto a 30°C seguito da 1 minuto a 80°C). La provetta viene poi riposta in ghiaccio per abbassare la temperatura. In seguito, occorre inserire gli adattatori di sequenziamento aggiungendo 1 µl di RAP ai 10 µl di DNA frammentato. Dopo aver mescolato adeguatamente e incubato 5 minuti a temperatura ambiente, la libreria di DNA

viene lasciata in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo. Una volta che la libreria è pronta si procede con il Priming della cella di sequenziamento. Con cura vengono rimossi i 20-30  $\mu\text{l}$  di Storage Buffer presenti nella flow cell.

Per preparare il *Priming mix* è necessario aggiungere 30  $\mu\text{l}$  di FLT direttamente nel tubo di FB. Dopo aver mescolato la soluzione, si prelevano 800  $\mu\text{l}$  e si inseriscono nel *priming port*, facendo attenzione a non introdurre bolle d'aria nella camera. A questo punto è necessario preparare la libreria al caricamento sul dispositivo.

In una nuova eppendorf vengono mescolati:

- 34  $\mu\text{l}$  di SQB
- 11  $\mu\text{l}$  di libreria DNA
- 4,5  $\mu\text{l}$  di nuclease-free water
- 25,5  $\mu\text{l}$  di LB (vortexare appena prima dell'uso per evitare il deposito delle biglie)

Dopo l'apertura della SpotON port, vengono aggiunti altri 200  $\mu\text{l}$  di Priming Mix al *priming port*. Come ultimo step, si inoculano goccia a goccia i 75  $\mu\text{l}$  di libreria nella SpotON port. Chiudere entrambe le porte, ed attivare la corsa mediante il programma MinKNOW.

## ***2.5. Esperimenti di Coniugazione***

La coniugazione è uno dei processi naturali attraverso cui ceppi batterici scambiano materiale genetico (plasmidi, trasposoni etc.). In questo caso sono stati effettuati esperimenti di coniugazione *in vitro* secondo due modalità differenti: in brodo e su filtro. In entrambe le procedure sono stati utilizzati come ceppi Donatori: *E. cloacae* 526797 (*Ecc1*), *E. cloacae* 554180/3 (*Ecc3*) ed *E. cloacae* 569195/2 (*Ecc5*) e come ceppo Ricevente *Escherichia coli* J53 Azide Resistente e plasmid free. In entrambe le procedure, in brodo e su filtro, occorre preparare delle sospensioni standardizzate di cellule Donatrici e Riceventi, portandole ad un valore di O.D. nota e poi mescolandole in un rapporto adeguato (D: R).

Per la rilevazione e la conta delle colonie dei diversi ceppi sono stati utilizzati i seguenti terreni selettivi:

- conta Donatore: terreno CLED o MC con l'aggiunta di 0,5 µg/ml di Ertapenem
- conta Ricevente: terreno al NaAzide
- conta Transconiuganti: terreno NaAzide con l'aggiunta di 0,5 µg/ml di Ertapenem.

### ***2.5.1. Coniugazione in brodo***

Le colture cresciute overnight in dei ceppi D e R sono state aggiustate ad una O.D. di 0,1 in TSB (misurata ad una lunghezza d'onda di 650 nm), mescolate in base ad un rapporto 1:5 (D: R) in un volume totale di 1 ml di brodo Luria Bertani (LB) e mantenute a 37°C in aerobiosi per 3 h in leggera agitazione. Al termine del periodo di incubazione, si procede allestendo diluizioni scalari 1:10 del brodo di coniugazione con Soluzione Fisiologica (SF). Aliquote di 10 µl di ciascuna diluizione (dalla 10<sup>-2</sup> alla 10<sup>-8</sup>) vengono inoculate sulla superficie delle piastre di selezione per la conta delle cellule D e R. Infine, si distribuisce il restante brodo di coniugazione sulle piastre per la selezione dei TC (0,1 ml/piastra) e si spatola fino ad assorbimento completo. Lasciare incubare in termostato a 37°C per 3h.

### ***2.5.2. Coniugazione su filtro***

Per la coniugazione su filtro, la preparazione dei ceppi D e R è identica alla coniugazione in brodo ma differisce al momento della fase di mescolamento nel rapporto 1:5. È necessario utilizzare un apparato di filtrazione accoppiato ad una pompa aspirante, che consente il passaggio del brodo attraverso un filtro con pori di diametro 0,20 µm. Il filtro va applicato sterilmente sulla superficie di MH o TSA (Tryptic Soy Agar) e incubato a 37°C per circa 3 h. Dopodiché



si procede al lavaggio del filtro, mediante sospensione in SF e si centrifuga a bassa velocità, per non lisare le cellule. Il pellet va risospeso in 1 ml di SF e si procede alla conta dei D, R e TC, come indicato sopra per la procedura in brodo.

### 3. RISULTATI

#### 3.1. Sensibilità agli antibiotici

La sensibilità a diverse classi di antibiotici (beta-lattamici, fluorochinoloni, aminoglicosidi) è stata valutata mediante entrambe le procedure di diffusione in agar e microdiluizione in brodo. Le MIC a Tigeciclina e Colistina sono state ottenute solo con il metodo di microdiluizione in brodo. I risultati sono stati interpretati in base ai valori *breakpoint* di riferimento di EUCAST per tutti gli antibiotici, ad eccezione della Tigeciclina, per cui sono stati utilizzati i valori di riferimento forniti da Food and Drug Administration (FDA).

I risultati di MIC ed il resistotipo risultante dei ceppi sono riportati nella tabella sottostante (**Tabella 11**).

Ceppo	mCIM	MIC									
		CAZ	FEP	IMI	MER	ETP	CIP	GEN	AK	TGC	COL
526797	Pos	>16	>16	8	16	16	4	2	2	8	≤ 0,5
534096	Pos	>16	>16	2	>16	16	1	1	2	4	≤ 0,5
554180/3	Pos	>16	>16	8	16	16	1	1	2	4	≤ 0,5
557644	Neg	0,25	≤0,12	1	2	0,25	≤0,06	0,25	1	4	≤ 0,5
569195/2	Pos	>16	>16	8	16	16	>8	8	2	4	1
611084	Neg	0,5	≤0,12	1	0,25	0,5	≤0,06	0,5	4	2	≤ 0,5
665167	Neg	>16	>16	1	0,03	1	>8	0,5	4	2	1
693563	Neg	>16	>16	1	0,25	4	≤0,06	0,5	2	2	≤ 0,5
695812/2	Neg	>16	8	1	1	0,5	≤0,06	0,25	2	1	1
748301	Pos	>16	>16	8	>8	16	≤0,06	2	2	2	2

Legenda: ■ R ■ S ■ NS

**Tabella 11.** Resistotipo dei ceppi in esame

Dalla tabella possiamo notare che per quanto riguarda gli antibiotici  $\beta$ -lattamici quasi tutti i ceppi sono resistenti alle cefalosporine di III (Cefotaxime, CAZ), mentre 6 ceppi sono resistenti alle cefalosporine di IV generazione (Cefepime, FEP). Il 50% dei ceppi risulta contemporaneamente resistente ad entrambe le cefalosporine in esame e ad almeno due molecole della classe di antibiotici carbapenemi. Da notare che questi 5 ceppi (526797; 534096; 554180/3; 569195/2; 748301) sono risultati positivi al test mCIM, indicando la produzione di un'attività carbapenemasi. 2 ceppi (557644; 611084) sono sensibili a tutti i  $\beta$ -lattamici utilizzati. Infine, 2 isolati (665167 e 693563) resistenti a CAZ e sensibili a FEP, dimostrano un basso livello di resistenza ad Ertapenem; i valori di MIC poco al di sopra del breakpoint di resistenza e la negatività al test mCIM indicano l'assenza di carbapenemasi e suggeriscono la presenza di meccanismi alternativi associati con la resistenza.

Relativamente agli antibiotici *Aminoglicosidi*, tutti i ceppi risultano sensibili all'Amikacina (AK), mentre solo 1 isolato (569195/2) è resistente alla Gentamicina. Invece per i *Fluorochinoloni*, il 50% dei ceppi risulta sensibile alla Ciprofloxacina (CIP), tutti con MIC  $\leq 0,06$   $\mu\text{g/ml}$ , il restante è resistente con MIC che varia da un basso livello di resistenza ad elevato (MIC range 1 -  $>8$   $\mu\text{g/ml}$ ). Infine, abbiamo valutato la sensibilità agli antibiotici Tigeciclina e Colistina, a quest'ultima i ceppi sono tutti sensibili; mentre per la Tigeciclina,

5 ceppi erano sensibili, 4 risultavano intermedi e 1 isolato (526797) era resistente.

### 3.2. Saggi di amplificazione

Applicando le tecniche di PCR e PCR Multiplex precedentemente descritte ed utilizzando primer di letteratura e di nostra produzione sono stati ottenuti i seguenti risultati. (Tabella 12 )

N° ceppo	TEM	SHV	OXA-1	KPC	VIM	NDM	OXA-48	IMP	<i>aadA</i> 1	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>catB2</i>	<i>sul1</i>
526797	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
534096	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
554180/3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
557644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
569195/2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
611084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
665167	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
693563	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
695812/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
748301	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

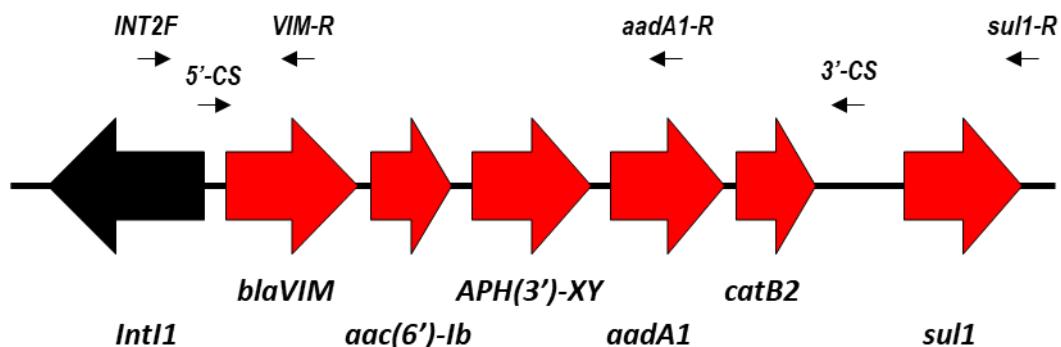
Tabella 12. Risultati analisi PCR.

La ricerca dei geni codificanti le principali classi di carbapenemasi ha evidenziato che 5 ceppi sono positivi per *bla*VIM. I risultati di amplificazione sono in accordo con il risultato ottenuto mediante il test mCIM ed evidenziano che il gene è effettivamente espresso. La produzione della carbapenemasi VIM è documentata dai valori di resistenza ottenuti per i carbapenemi (Tabella 11).

Riguardo le altre beta-lattamasi solo 1 isolato (665167) era positivo per *bla*OXA-1 e 1 altro isolato (748301) era *bla*SHV positivo. Nessun isolato

presentava *bla*TEM. I 5 ceppi VIM-positivi sono risultati positivi anche per la ricerca degli altri geni di resistenza *aadA1*, *aac(6')-Ib*, *catB2* e *sul1*.

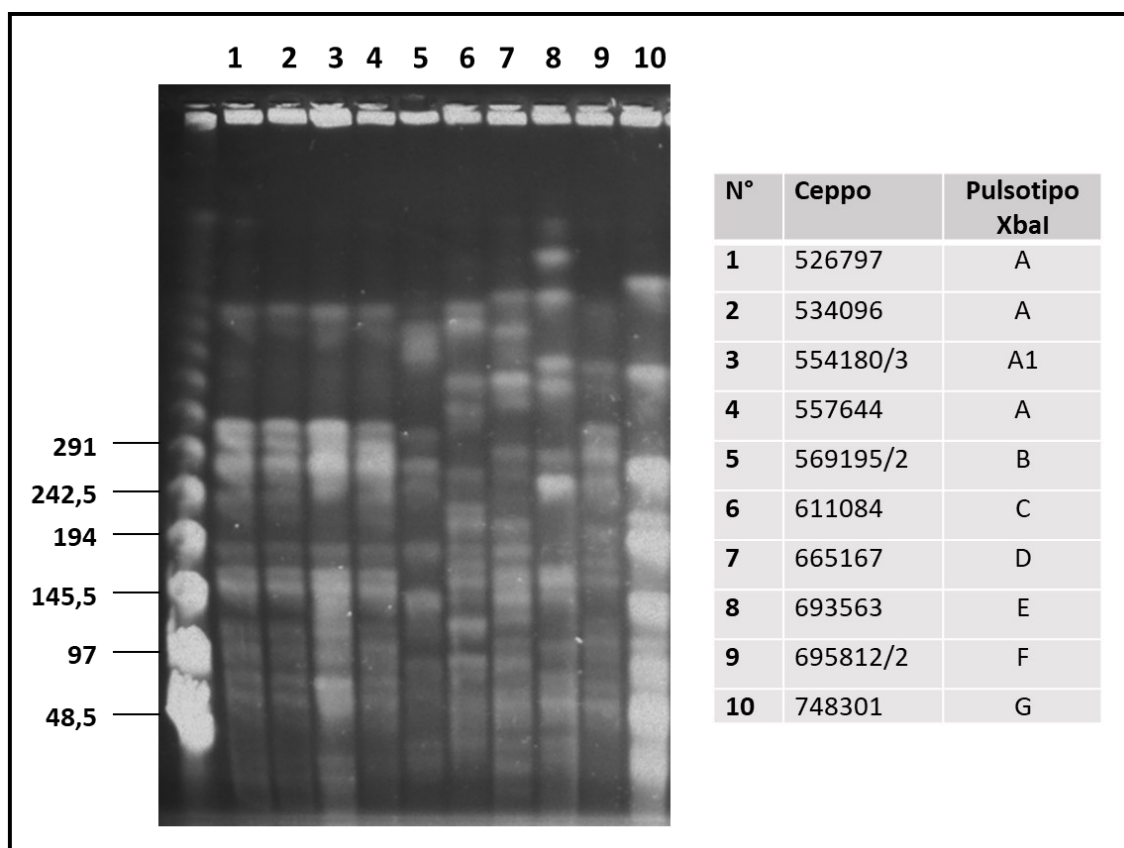
Complessivamente, i dati di amplificazione ottenuti per i 5 geni *bla*VIM-positivi ed in base ai dati di letteratura, è stata ipotizzata la presenza di un integrone di classe 1 (Lauretti, 1991; Poirel, 2001) quale elemento genetico associato. L'integrone è stato studiato e mappato utilizzando diversi primer che marciano le regioni 5' e 3' terminali (class 1 F/R), il gene funzionale dell'integrasi (INT2F) e le cassette geniche di resistenza (VIM-R, *aadA1*-R, *sul1*-R). In base ai risultati di amplificazione è stata dedotta la dimensione molecolare dell'integrone (ca. 6 kb) e la sua mappa fisica. Tale organizzazione risulta identica in tutti i 5 ceppi come vediamo in **Figura 9**.



**Figura 9.** Mappa fisica dell'integrone di classe 1 identificato nei ceppi VIM-positivi. Sono indicati il gene di integrasi, i geni di resistenza. Le frecce indicano la posizione dei primer.

### 3.3. Tipizzazione mediante analisi XbaI-PFGE e S1-PFGE

I profili dei ceppi in esame ottenuti mediante l'analisi XbaI-PFGE e la relativa interpretazione sono riportati in **Figura 10** sottostante

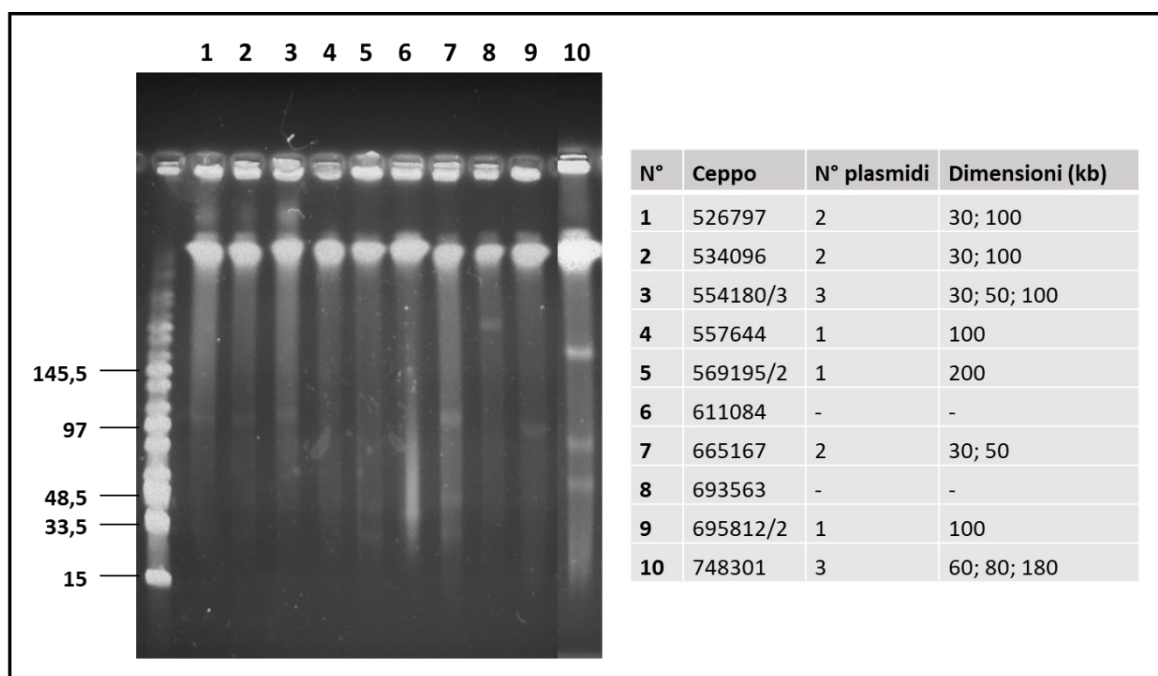


*Figura 10. Pulsotipi dei 10 ceppi ottenuti mediante XbaI-PFGE.*

È stato identificato un cluster principale costituito dai primi 4 isolati e altri 6 pulsotipi distinti. In particolare, possiamo notare come i primi due ceppi (526797 e 534096) e il quarto (557644) sono indistinguibili tra loro, hanno identico pulsotipo A, e sono strettamente correlati con il terzo (554180/3) che

ha pulsotipo A1. Gli altri ceppi risultano avere tutti pulsotipi differenti e pertanto non sono correlati al cluster principale.

Dall'analisi in PFGE con digestione tramite S1 si sono ottenuti i seguenti risultati (**Figura 11**). Le dimensioni molecolari dei plasmidi (kb) sono stimate in base al marker di PFGE (midrange PFGE).



*Figura 11. Risultati in PFGE dopo digestione con S1*

### **3.3. Nanopore: analisi di sequenza**

Le sequenze sono state assemblate mediante Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>) ed analizzate mediante i software

online ResFinder, PlasmidFinder, MLST disponibili sul sito *Center for Genomic Epidemiology (CGE)*.

### **3.3.1. Multi Locus Sequence Typing (MLST)**

Mediante il software online sono state analizzate le sequenze di 8 dei 10 ceppi di *Enterobacter cloacae* complex in esame per ottenere i rispettivi Sequence Types (STs) (**Tabella 13**).

<i>Ceppo</i>	<i>Sequence Type (ST)</i>
526797	45
534096	45
554180/3	45
557644	45
569195/2	182
611084	386
665167	-
693563	-
695812/2	106
748301	286

**Tabella 13.** Risultati ottenuti in CGE tramite MLST

Dalla tabella si può notare che i primi 4 ceppi (526797, 534096, 554180/3 e 557644) presentano lo stesso Sequence Type 45, mentre gli altri hanno tutti Sequence Type diversi.



### 3.3.2. ResFinder e PlasmidFinder

Dai risultati ottenuti attraverso questi due software di analisi online si sono potute ottenere più informazioni genetiche rispetto ai dati ottenuti con le altre tecniche (**Tabella 14**). Innanzitutto, l'analisi ResFinder conferma la presenza dei geni di resistenza identificati in precedenza mediante PCR, ed evidenzia un numero addizionale di geni di resistenza ad altre classi di antibiotici. L'analisi PlasmidFinder identifica e classifica i diversi *replicons* plasmidici. In particolare, è stato possibile identificare in quasi tutti i ceppi un plasmide addizionale, Col(pHAD28), non rilevato mediante S1-PFGE date le ridotte dimensioni (2,4 kb).

Ceppo	Replicons	Dimensioni (kb)	Geni di antibiotico-resistenza
526797	Col(pHAD28)	2,4	-
	IncN	40	VIM-1; sul1; catB2; aadA1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; qacE; qnrS1; mphA
	IncFII(pECLA); IncFIB (pECLA)	115	aph(3'')-Ib (strA); aph(6)-Id (strB); sul2; dfrA14; catA2
534096	Col(pHAD28)	2,4	-
	IncN	40	VIM-1; sul1; catB2; aadA1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; qacE; qnrS1; mphA
	IncFII(pECLA); IncFIB (pECLA)	115	aph(3'')-Ib (strA); aph(6)-Id (strB); sul2; dfrA14; catA2
554180/3	Col(pHAD28)	2,4	-
	IncN	40	VIM-1; sul1; catB2; aadA1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; qacE; qnrS1; mphA
	IncFII(pECLA); IncFIB (pECLA)	115	aph(3'')-Ib (strA); aph(6)-Id (strB); sul2; dfrA14; catA2
	RepA(pENTd4a)	80	-
557644	Col(pHAD28)	2,4	-
	IncFII(pECLA); IncFIB (pECLA)	115	dfrA14
569195/2	IncN	49,2	VIM-1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; aadA1; catB2; qacE; sul1; qnrS1

	IncFII(pECLA); IncFIB (pECLA)	215	OXA-10; aadA1; ant(2'')-Ia; sul1; tet(D); qacE; catB8
611084	-	-	-
695812/2	IncFIB(H89- PhagePlasmid)	100	-
748301	Col(phAD28)	2,4	-
	IncFIB(pECLA)	115	-
	IncFII(pECLA)		
	IncA	200	blaVIM-1; blaSHV-12; sul1; dfrA14; aac(6')-Ib3; aadA1; aac(6')-Ib-cr; catB2; mph(A); qacE
	IncR	75	-

**Tabella 14.** Analisi mediante ResFinder e PlasmidFinder

**Legenda dei geni e delle resistenze conferite (classi di antibiotici)**

*VIM* ( $\beta$ -lattamici – penicilline, cefalosporine, carbapenemici)

*SHV-12* ( $\beta$ -lattamici – penicilline, cefalosporine, monobattamici)

*OXA-10* ( $\beta$ -lattamici – penicilline, monobattamici)

*qacE* (composti ammonio quaternario - clorexidina, bromuro di etidio, benzilconio cloruro)

*aac(6')-Ib-cr* (aminoglicosidi e ciprofloxacina)

*aadA1* (aminoglicosidi)

*aac(6')-Ib3* (aminoglicosidi)

*aph(3')-XV* (aminoglicosidi)

*ant(2'')-Ia* (aminoglicosidi)

*aph(6)-Id* (aminoglicosidi)

*aph(3'')-Ib* (aminoglicosidi)

*sul1, sul2* (sulfamidici)

*dfrA14* (trimetoprim)

*catA2* (cloramfenicolo)

*catB2, catB8* (cloramfenicolo)

*mph(A)* (macrolidi)

*qnrS1* (chinoloni - ciprofloxacina)

*tetD* (tetraciline)

È stato inoltre possibile evidenziare che nei primi ceppi resistenti ai carbapenemi isolati nel 2019 il gene *blaVIM* è portato da un plasmide IncN (con dimensioni variabili da 40 a 50 kb), mentre nel ceppo 748301, isolato nel 2022, il gene *blaVIM* è presente in un grosso plasmide di resistenza (ca 200 kb) appartenente al gruppo di incompatibilità IncA. Da notare che questo

plasmide contiene, oltre a *blaVIM*, il gene *blaSHV-12*, che codifica per una beta-lattamasi a spettro esteso.

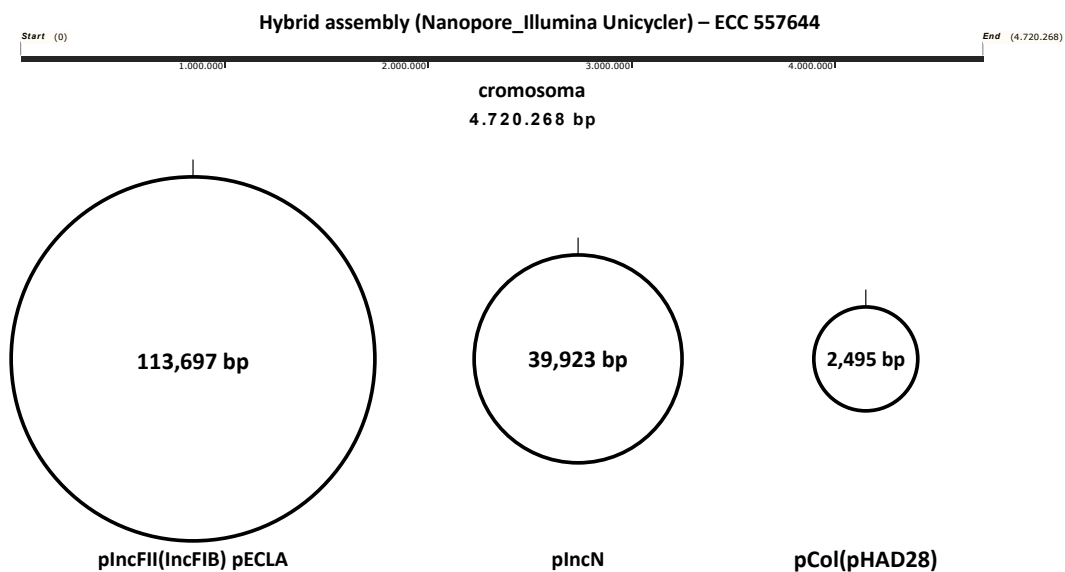
### ***3.4. Assemblaggio ibrido: Nanopore e Illumina***

Considerando insieme i risultati ottenuti con le procedure fenotipiche (mCIM e antibiogramma), genotipiche (XbaI-PFGE) e di sequenziamento (Nanopore MinIon), è stato possibile dedurre che i primi 4 isolati sono appartenenti ad uno stesso clone (ST45), che il gene codificante la carbapenemasi VIM (*blaVIM-1*) è associato ad un integrone di classe 1, contenuto in un plasmide IncN di 40 kb. Tuttavia, tale plasmide è presente solo nei primi 3 ceppi, che difatti condividono le caratteristiche di resistenza ai carbapenemi, mentre è assente nel quarto isolato (557644) del cluster A. La perdita del plasmide IncN si accompagna alla perdita della resistenza ai carbapenemi.

Pertanto, al fine di studiare il clone ST45 e caratterizzare il plasmide IncN, che veicola il gene *blaVIM-1*, è stato eseguito il sequenziamento del primo isolato (526797) mediante la tecnologia Illumina (MiSeq Reagent Kit v3; 2 x 250 bp) ed eseguendo un assemblaggio ibrido delle sequenze ottenute con i due sistemi (Illumina e Nanopore) tramite il programma Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Questa procedura permette di ottenere

dei risultati più precisi, poiché combina l'accuratezza del sequenziamento mediante Illumina con le *long reads* ottenute mediante Nanopore.

I dati di sequenza ottenuti hanno consentito di definire la dimensione molecolare del cromosoma (4,720,268 bp) e dei tre plasmidi contenuti nel ceppo in esame: IncFII(pECLA)/IncFIB(pECLA) di 113,697 bp, IncN di 39,923 bp e Col(pHAD28) di 2,495 bp (**Figura 12**).



**Figura 12.** Organizzazione del genoma di 526797.

Il plasmide, denominato pECC526(VIM), è stato caratterizzato in dettaglio ed è stata estrapolata la mappa genica utilizzando il software SnapGene Viewer 5.3 (**Figura 13**). pECC526(VIM) è una molecola circolare di 39,923

bp, appartenente al gruppo di incompatibilità N (IncN) e contiene 40 ORF, inclusi i geni di resistenza *bla*VIM-1, *aacA4*, *aphA15*, *aadA1*, *catB2*, *qacEΔ1*, *sul1*, associati all'integrone di classe 1, i geni di resistenza *qnrS1*, *mphA*, ed i geni funzionali essenziali per la replicazione, il mantenimento e il trasferimento genico orizzontale.

Gene	Size (bp)	Funzione
<b>Integrone di classe 1</b>		
<i>Int1</i>	1014	<i>class 1 integron integrase Int1</i>
VIM-1	801	<i>subclass B1 metallo-beta-lactamase VIM-1</i>
<i>aac(6')-Ib-cr (aacA4)</i>	555	<i>aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib4</i>
APH(3')-XV ( <i>aphA15</i> )	795	<i>aminoglycoside O-phosphotransferase APH(3')-XV</i>
<i>aadA1</i>	792	<i>ANT(3'')-Ia family aminoglycoside nucleotidyltransferase AadA1</i>
<i>catB2</i>	633	<i>type B-2 chloramphenicol O-acetyltransferase</i>
<i>qacEΔ1</i>	348	<i>quaternary ammonium compound efflux SMR transporter QacE delta 1</i>
<i>sul1</i>	840	<i>sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase</i>
<b>Altri geni di resistenza di pECC797(VIM)</b>		
<i>qnrS1</i>		
<i>mphA</i>		

**Tabella 15.** Geni di resistenza veicolati dal plasmide pECC526(VIM).

Altri geni di antibiotico-resistenza - *aph(3'')-Ib (strA)*; *aph(6)-Id (strB)*; *sul2*; *dfrA14*; *catA2* - sono veicolati dal plasmide IncFII(pECLA)/IncFIB(pECLA), di 113,697 bp, mentre il piccolo plasmide Col(pHAD28) ne è privo. Infine, sul cromosoma è presente un gene *bla*ACT-17 codificante una β-lattamasi di classe C (cefalosporinasi AmpC-like).

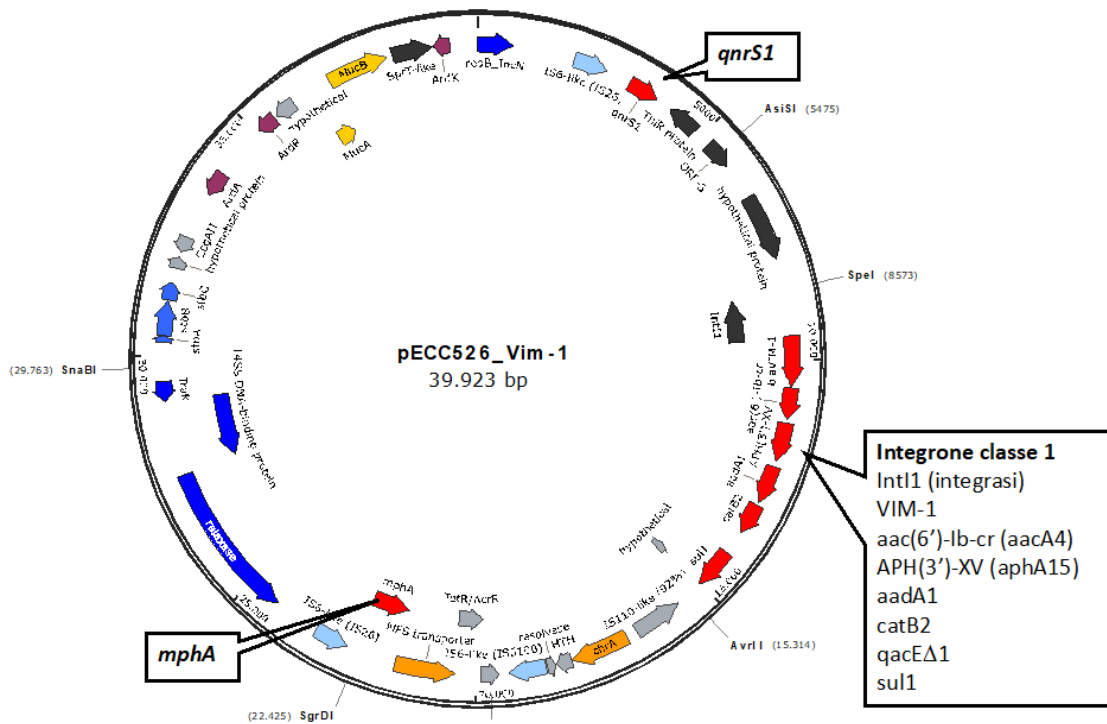
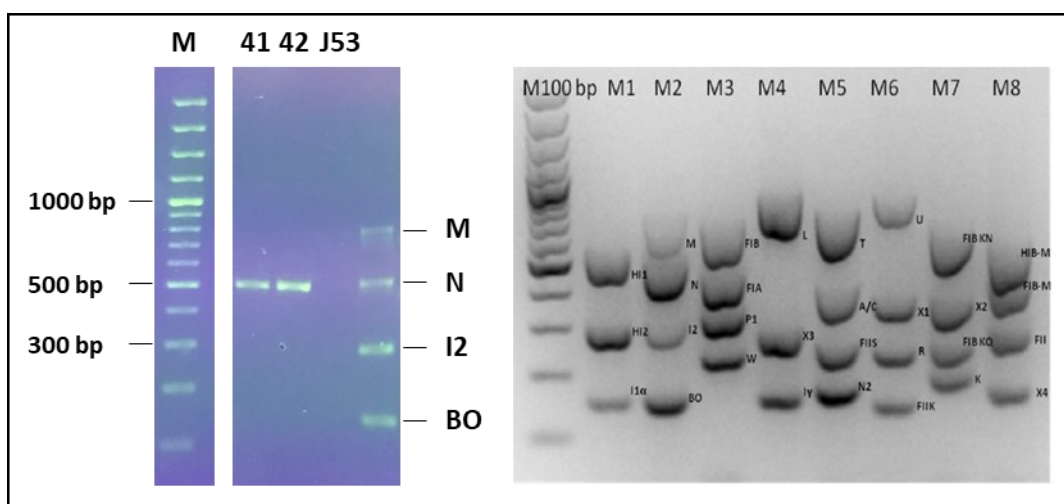


Figura 13. Mappa dei geni del plasmide pECC526(VIM).

### 3.5. Esperimenti di Coniugazione

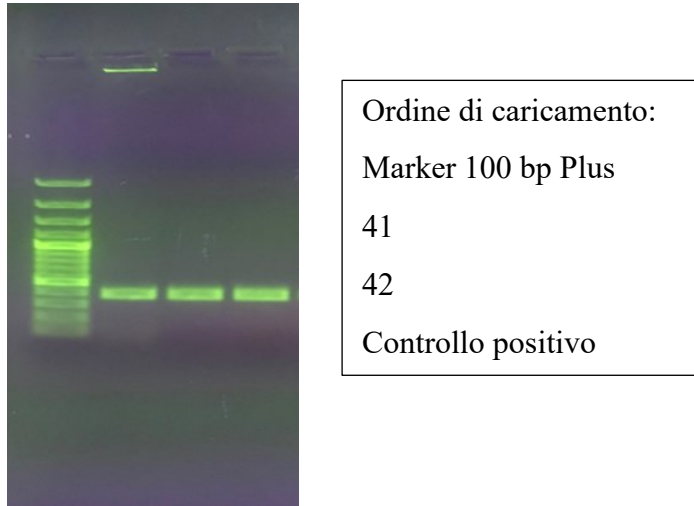
Per valutare il trasferimento orizzontale di *bla*VIM sono stati svolti diversi esperimenti di coniugazione utilizzando come donatori tre ceppi resistenti ai carbapenemi: il primo isolato 526797 (ST45, pulsotipo A), il ceppo 554180/3 (ST45, pulsotipo A1) che presenta un plasmide aggiuntivo [RepA(pENTd4a)] ed il ceppo 569195/2 (ST182, pulsotipo B). Quest'ultimo, in base ai dati di sequenziamento (Tabella 14), mostrava la stessa sequenza di geni di resistenza, che erano associati ad un integrone di classe 1, portato da un plasmide IncN di dimensioni maggiori (ca 50 kb).

Gli esperimenti di coniugazione condotti usando il ricevente *E. coli* J53 sodio-azide resistente hanno prodotto i seguenti risultati. Nonostante diversi tentativi, utilizzando entrambe le procedure in brodo e su filtro, non sono stati ottenuti transconiuganti dai ceppi donatori 526797 e 569195/2. Viceversa, sono stati ottenuti transconiuganti dal ceppo 554180/3, sebbene con bassissima frequenza ( $7,14 \times 10^{-10}$ ). Due ceppi (41 e 42) sono stati selezionati dal pool di circa 50 transconiuganti ottenuti dall'incrocio su filtro per le successive analisi fenotipiche e genotipiche. L'indagine XbaI-PFGE ha confermato un profilo di restrizione identico al ricevente *E. coli* J53, mentre l'analisi S1-PFGE ha evidenziato il trasferimento del plasmide di 40 kb del donatore, probabilmente corrispondente a IncN. La conferma del trasferimento di IncN nei due transconiuganti è stata condotta mediante analisi *PCR based replicon typing* (Carattoli, 2005) utilizzando il PBRT kit 2.0 (Diatheva Fano, PU, Italy).



**Figura 14.** Analisi mediante PBRT kit 2.0. I transconiuganti 41 e 42 sono positivi solo per IncN (514 bp) del mix di reazione 2.

Mediante analisi di PCR è stata confermata la positività per *blaVIM* in entrambi i ceppi 41 e 42.



**Figura 15.** Trasferimento di *blaVIM*

Inoltre, entrambi i campioni erano positivi per l'integrasi *IntI1* e per gli altri geni dell'integrone di classe 1, *aadA1*, *aac(6')-Ib*, *catB2*, *sull1*, confermando il trasferimento orizzontale dell'intero elemento genetico dal donatore *E. cloacae* 554180/3.

La caratterizzazione fenotipica è stata condotta valutando le MIC ai carbapenemi: entrambi i ceppi sono resistenti all'ertapenem (MIC, 4 µg/ml), non sensibili all'imipenem (MIC, 4 µg/ml) e sensibili al meropenem (MIC 1 µg/ml). Entrambi i transconiuganti sono risultati positivi al test mCIM, che identifica l'attività carbapenemasi.



Infine, il transconiugante 42 è stato sequenziato mediante la tecnologia Nanopore MinION. L'analisi delle sequenze mediante i programmi disponibile sulla piattaforma CGE (<https://www.genomicepidemiology.org/>) ha confermato il trasferimento del plasmide IncN e di tutti i geni di resistenza ad esso associati, ma ha consentito di evidenziare il co-trasferimento del plasmide Col(pHAD28) di 2,4 kb.

SpecieFinder	PlasmidFinder	ResFinder	
		Integrone di classe 1	Altri geni di resistenza
<i>Escherichia coli</i>	IncN	<i>bla</i> VIM-1; <i>aac</i> (6')-Ib-cr; <i>aph</i> (3')-XV; <i>aadA1</i> ; <i>catB2</i> ; <i>qacE</i> ; <i>sul1</i>	<i>qnrS1</i> ; <i>mphA</i>
	Col(pHAD28)	-	-

**Tabella 16.** Analisi di sequenza del transconiugante 42.

## 4. DISCUSSIONE

*Enterobacter cloacae* complex (ECC) rappresenta un gruppo di batteri emergente. La resistenza intrinseca a diversi antibiotici beta-lattamici, la capacità di acquisire altri determinanti di resistenza, la capacità di sopravvivenza, la molteplicità delle fonti d'infezione, soprattutto in ambito ospedaliero possono contribuire alla diffusione.

Lo studio ha analizzato 10 ceppi non duplicati di ECC, isolati da campioni clinici ottenuti da pazienti ricoverati dal 2019 alla prima metà del 2022. Le indagini fenotipiche indicano che il 50% dei ceppi è resistente ai carbapenemi. Tale resistenza è dovuta alla produzione di una carbapenemasi come si evidenzia dalla positività al test mCIM (*Pierce, 2017*). Due isolati sono sensibili a tutti i  $\beta$ -lattamici, tre ceppi sono resistenti alle cefalosporine di III e IV generazione e due di questi sono resistenti anche all'ertapenem, sebbene a basso livello. Riguardo gli altri antibiotici non  $\beta$ -lattamici, tutti i ceppi sono sensibili alla colistina e agli aminoglicosidi, eccetto 1 unico isolato che è resistente alla gentamicina. Il 50% dei ceppi è resistente ai fluorochinoloni. Infine, 5 ceppi sono sensibili alla tigeciclina, 4 sono intermedi e 1 è resistente. Nelle successive indagini genotipiche i 5 ceppi carbapenemi-resistenti presentavano il gene *blaVIM*, la cui espressione è evidenziata dal test mCIM

positivo. Un isolato era positivo per OXA-1 e un altro isolato presentava *blaSHV*. Nessun ceppo era positivo per *blaTEM* o *blaCTX*.

I risultati di amplificazione hanno evidenziato che i 5 ceppi VIM-positivi possiedono altri geni di resistenza, quali *aac(6')-Ib*, *aadA1* e *sul1*. Questi dati suggerivano la presenza di un integrone di classe 1, come riportato in letteratura per altre specie batteriche (*Lauretti, 1999; Poirel 2001*). Dopo attenta analisi è stato possibile ottenere l'organizzazione genica dell'integrone di classe 1, che risulta essere identica in tutti i 5 ceppi VIM-produttori.

Mediante indagini di tipizzazione è stato possibile analizzare la relazione genetica dei ceppi. Sono stati evidenziati 7 distinti profili di restrizione XbaI (A-G); i primi 4 campioni isolati nel 2019 rappresentavano un *cluster*, 3 ceppi erano identici come profilo e 1 ceppo era strettamente correlato. È interessante notare che uno dei ceppi del cluster (557644), pur essendo geneticamente identico come profilo di restrizione (pulsotipo A), risultava sensibile a tutti i  $\beta$ -lattamici considerati e privo di tutti i geni dell'integrone di classe 1. Altre indagini di tipizzazione (S1-PFGE) confermavano la perdita di un plasmide di circa 40 kb rispetto ai primi tre ceppi del clone, che era presumibilmente associata con la perdita della resistenza ai carbapenemi e con l'assenza di VIM. Il sequenziamento ha consentito di approfondire le conoscenze riguardo il resistoma dei ceppi ECC resistenti ai carbapenemi mediata dal gene *blaVIM*,

nonché il contenuto plasmidico ed il Sequence type e di confermare i dati precedentemente ottenuti relativi al cluster principale.

Infatti, i primi quattro isolati (526797, 534096, 554180/3 e 557644) con pulsotipi A e A1 rappresentavano un clone, ossia una specifica linea genetica, di ST45. L'unica differenza era nel numero di plasmidi in questi isolati: i primi due erano identici, contenevano 2 plasmidi di resistenza distinti [IncFIB/IncFII(pECLA) di 115 kb e IncN di 40 kb, che contiene *bla*VIM e l'integrone di classe 1] e un piccolo plasmide [Col(pHAD28) di 2,4 kb] che non era visibile in S1-PFGE; il terzo isolato presentava un plasmide aggiuntivo [RepA(pENTd4a) di 80 kb] che non portava alcun gene di resistenza. Il quarto isolato conteneva solo IncFIB/IncFII(pECLA) e Col(pHAD28) dimostrando la perdita del plasmide IncN e di tutti i geni di resistenza ad esso associati.

I dati di sequenza ottenuti dall'assemblaggio ibrido nel primo isolato (526797) indicano che l'integrone di classe 1 portato dal plasmide IncN nei tre ceppi ST45 è quasi identico (99,95%) al corrispondente elemento contenuto nei plasmidi p3846\_IncN\_VIM-1 di *Enterobacter cloacae* e pIB2020\_IncA di *Enterobacter kobei* (Marchetti,2021). L'organizzazione genica è inoltre identica agli integroni In916 dei ceppi ECC isolati in Francia (Emeraud,2022). Il plasmide IncN portante *bla*VIM è stato riscontrato anche nel ceppo 569195/2, ma risulta di dimensioni leggermente maggiori. Esso inoltre contiene

un plasmide di gruppo IncFIB/IncFII(pECLA) di 215 kb che veicola molti altri geni di resistenza ed è assente il plasmide Col(pHAD28).

Le prove di coniugazione hanno dimostrato che il gene *bla*VIM era trasferibile solo dal donatore 554180/3, sebbene a bassissima frequenza. I transconiuganti presentavano il plasmide IncN di 40 kb contenente VIM-1, che conferiva una resistenza variabile ai diversi carbapenemi ed il plasmide Col(pHAD28).

L'ultimo isolato in ordine cronologico VIM-produttore ed il solo ottenuto nel 2022 (748301) aveva un profilo plasmidico completamente diverso: condivideva, con il cluster principale ST45, solo i plasmidi IncFIB/IncFII(pECLA) di 115 kb e Col(pHAD28) di 2,4 kb, e conteneva altri due plasmidi, IncR di 75 kb e IncA di 200 kb, quest'ultimo veicolante tutti i geni di resistenza, compreso *bla*VIM.

Complessivamente, i nostri risultati indicano un cambiamento nella genetica della carbapenemasi VIM nell'ambito dei ceppi ECC. Il gene *bla*VIM, inizialmente veicolato da un plasmide IncN nei ceppi appartenenti al clone ST45 e nel ceppo con ST182, tutti isolati nel 2019, nell'ultimo periodo di analisi è stato identificato all'interno di un plasmide di un distinto gruppo di incompatibilità IncA, che contiene anche un gene *bla*SHV-12, codificante per una ESBL.

Nonostante il numero limitato di ceppi analizzati, i risultati forniscono informazioni utili riguardo la circolazione e la diversità dei ceppi ECC nel corso

del periodo considerato. Infatti, su 10 isolati clinici studiati, sono stati identificati 7 ST differenti. I primi quattro isolati appartenevano allo stesso ST45, ma ciononostante mostravano una diversità genetica in termini di contenuto plasmidico. Tutti gli altri isolati erano profondamente diversi tra loro per caratteristiche fenotipiche e genotipiche. Tale diversità genetica ed una circolazione non clonale è stata evidenziata anche da un recente studio di sorveglianza, svolto in Francia: su un totale di 149 ceppi ECC produttori di *bla*VIM sono stati identificati 38 ST differenti, con una prevalenza di ST873 e ST66 e nessuna chiara correlazione tra ST e tipo di carbapenemasi VIM prodotta (Emereud,2022).

I nostri dati, in accordo con quelli di letteratura, suggeriscono che la popolazione dei ceppi ECC resistenti e carbapenemasi produttori sia molto più eterogenea di quanto riportato per le altre specie CP-CRE come *K. pneumoniae*. Gli studi di sorveglianza in Italia mostrano una situazione di epidemia da questa specie relativa alla circolazione di pochi gruppi clonali (CG258) e nonostante siano in corso dei cambiamenti epidemiologici, CG258 è rimasta la linea genetica più comune (Di Pilato,2020). Di conseguenza, è importante caratterizzare e studiare l'epidemiologia dei batteri CP-CRE, comprese le specie meno comunemente isolate del gruppo *Enterobacterales*. Esse rappresentano un piccolo ma potenzialmente importante sottoinsieme dei CP-CRE, spesso trascurato o non correttamente identificato; si stima infatti

che la reale proporzione dei CP-CRE meno comuni sia limitata dalla mancanza di test sistematici. Inoltre, molte delle carbapenemasi prodotte in queste specie meno comuni non sono KPC (*Maroya, 2018*). Pertanto, è necessario ampliare la sorveglianza, includendo nelle indagini una gamma più ampia di specie CP-CRE. Accanto alle procedure tradizionali di indagine, le nuove tecnologie di sequenziamento possono fornire informazioni preziose per comprendere meglio il potenziale impatto di questi generi meno comuni sulla diffusione della resistenza ai carbapenemi.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Annavajhala, M.K.; Gomez-Simmonds, A.; Uhlemann, A.C. Multidrug-resistant enterobacter cloacae complex emerging as a global, diversifying threat. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 44. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044>.
- Bellino Stefania, Simone Iacchini, Monica Monaco, Maria Del Grosso, Romina Camilli, Giulia Errico\*, Fortunato “Paolo” D'Ancona, Annalisa Pantosti, Patrizio Pezzotti. AR-ISS: Sorveglianza Nazionale dell'antibiotico resistenza 2019. *Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità.* ([https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-1\\_2020.pdf](https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-1_2020.pdf)).
- Bush K. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *J Infectare Chemother.* 2013 agosto;19(4):549-59. doi: 10.1007/s10156-013-06407.
- Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18



- Carattoli A, Bertini A, Villa LV, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228 (2005).
- Dalenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(3):490-495. doi:10.1093/jac/dkp498
- Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(4). doi:10.1128/CMR.00002-19
- Di Pilato V, Errico G, Monaco M et al. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *J. Antimicrob. Chemother.* 76(2), 355–361 (2021).
- Emeraud Cécile, Caroline Petit<sup>1</sup>, Lauraine Gauthier<sup>1</sup>, Rémy A. Bonnin, Thierry Naas and Laurent Dortet. Emergence of VIM-producing

Enterobacter cloacae complex in France between 2015 and 2018. *J Antimicrob Chemother.* 2022 Mar 31;77(4):944-951. doi: 10.1093/jac/dkab471.

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. (<http://www.eucast.org/>)
- Food and Drug Administration. Antibacterial Susceptibility Test Interpretive Criteria. (2019). <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/antibacterial-susceptibility-test-interpretive-criteria>
- Goodwin Sara, John D Mc Pherson, W Richard McCombie. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics.* 2016; 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.
- Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA. Establishment of a universal size standard strain for use with the pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* 43(3), 1045–1050 (2005).

- Lauretti L, ML Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, G.M. Rossolini. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 1999; 43(7):1584-90. doi: 10.1128/AAC.43.7.1584.
- Maroya S. Walters, PhD; Medora Witwer, MPH; Yeon-Kyeng Lee, PhD; Valerie Albrecht, MPH; David Lonsway, MMSc; J. Kamile Rasheed, PhD; Melissa Anacker, PhD; Paula Snippes-Vagnone; Ruth Lynfield, MD; Alexander J. Kallen, MD. Carbapenemase-Producing CarbapenemResistant Enterobacteriaceae from Less Common Enterobacteriaceae Genera — United States, 2014–2017. A cura di [Centers for Disease Control and Prevention \(USA\)](#), Serie: *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol.67, N° 23. Giugno 2018.
- Mattoni Marchetti V, Ibrahim Bitar , Mario Sarti , Elena Fogato , Erika Scaltriti , Chiara Bracci , Jaroslav Hrabak , Stefano Pongolini, Roberta Migliavacca. Genomic Characterization of VIM and MCR Co-Producers: The First Two Clinical Cases, in Italy. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(1):79. doi: 10.3390/diagnostics11010079.

- Medini K, Annavajhala, Angela Gomez-Simmonds and Anne-Catrin Uhlemann. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol.* 2019. 31;10:44.doi: 10.3389/fmicb.2019.00044.
- Nordmann P, and Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* 20(9), 821–830 (2014). doi: 10.1111/1469-0691.12719.
- Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2321–2333 (2017).
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, and NORDMANN P. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.* 2001; doi: 10.1128/AAC.45.9.2598–2603., p. 2598–2603 Vol. 45, No. 9

- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
- Polanco, I. S. (2021). Sequenziamento di seconda generazione o Next Generation Sequencing. Tratto da microbiologiaitalia.it: <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/sequenziamento-di-seconda-generazione-o-next-generation-sequencing>.
- PulseNet International. STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR PULSENET PFGE OF ESCHERICHIA COLI O157:H7, ESCHERICHIA COLI NON-O157 (STEC), SALMONELLA SEROTYPES, SHIGELLA SONNEI AND SHIGELLA FLEXNERI. Updated March 2013.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

- Tenover FC, Arbeit RD, Goering R, et al. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Vol 33.; 1995.
- Valeri Piera (2021). Il MinION, un intero laboratorio sul palmo di una mano. Tratto da microbiologiaitalia.it: <https://www.microbiologiaitalia.it/testmicrobiologici/il-minion-un-intero-laboratorio-sul-palmo-di-una-mano>.
- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO (2017). <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/O>



