



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

**Resistenza antimicrobica e relazione  
genetica di ceppi colonizzanti appartenenti  
al complesso *Enterobacter cloacae***

Relatore:

***Chiar.ma Prof.ssa Marina Mingoia***

Tesi di Laurea di:

***Arianna Silvestri***

Correlatore:

***Dott.ssa Gloria Magi***

Anno Accademico 2020/2021

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....   | 3  |
| <b>1.1</b> <i>Le <math>\beta</math>-lattamasi</i> .....                      | 4  |
| <b>1.2</b> <i>Meccanismi di resistenza ai carbapenemi</i> .....              | 6  |
| <b>1.3</b> <i>Scopo della ricerca</i> .....                                  | 7  |
| <b>2. MATERIALI E METODI</b> .....   | 9  |
| <b>2.1</b> <i>Ceppi batterici</i> .....                                      | 9  |
| <b>2.2</b> <i>Terreni di coltura e principali soluzioni utilizzate</i> ..... | 10 |
| <b>2.3</b> <i>Determinazione del resistotipo</i> .....                       | 12 |
| <b>2.3.1</b> <i>Antibiogramma</i> .....                                      | 12 |
| <b>2.3.2</b> <i>Minima Concentrazione Inibente (MIC)</i> .....               | 13 |
| <b>2.4</b> <i>Determinazione del resistoma e tipizzazione genomica</i> ..... | 14 |
| <b>2.4.1</b> <i>Estrazione del DNA</i> .....                                 | 15 |
| <b>2.4.2</b> <i>Tecniche di PCR e PCR multiplex</i> .....                    | 16 |
| <b>2.4.3</b> <i>Elettroforesi su gel di agarosio</i> .....                   | 18 |
| <b>2.4.4</b> <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)</i> .....            | 20 |
| <b>3. RISULTATI</b> .....  | 24 |
| <b>3.1</b> <i>Sensibilità agli antibiotici</i> .....                         | 24 |
| <b>3.1.1</b> <i>Antibiogramma</i> .....                                      | 24 |
| <b>3.1.2</b> <i>MIC</i> .....  | 24 |
| <b>3.2</b> <i>Resistoma</i> .....  | 27 |
| <b>3.3</b> <i>Pulsotipo- XbaI PFGE</i> .....                                 | 28 |
| <b>4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....                                    | 31 |
| <b>4.1</b> <i>Conclusioni</i> .....  | 33 |
| <b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 34 |
| <b>RINGRAZIAMENTI</b> .....  | 37 |

## 1. INTRODUZIONE

La resistenza dei microrganismi agli antibiotici rappresenta un grande problema di attualità per la Sanità di tutto il mondo, tanto da spingere la *World Health Organization* (WHO) a creare una lista di priorità dei patogeni che necessitano di particolare attenzione, in modo da aiutare e indirizzare la ricerca verso lo sviluppo di nuovi farmaci efficaci o nuove combinazioni. Le classi di priorità sono 3: 1- critica, 2- alta e 3- media.

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

**Tabella 1.** Classi di priorità (WHO 2017)<sup>1</sup>.

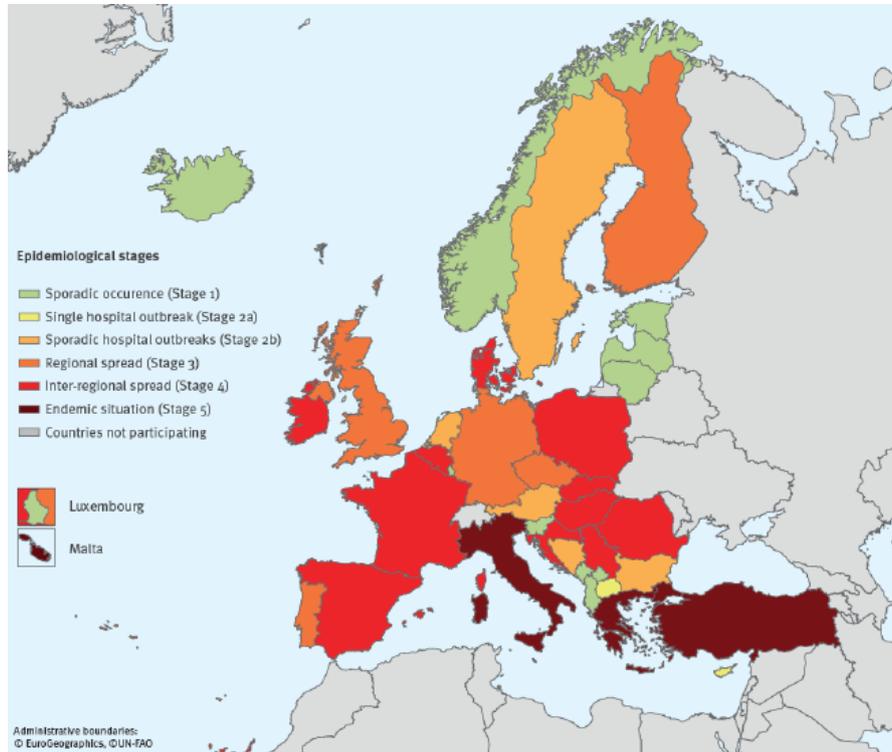
Come si può osservare dalla tabella 1, alla classe di priorità 1 appartengono le *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*) resistenti ai carbapenemi e alle cefalosporine di terza generazione.

Il motivo dell'importanza attribuita a questi batteri risiede nella loro capacità di essere resistenti agli antibiotici di ultima generazione, i carbapenemi, spesso considerati come antibiotici *last-line* nella prevenzione e trattamento di infezioni provocate da batteri multiresistenti (MDR).

Una particolare attenzione è rivolta alle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE), dato il rapido incremento negli ultimi due decenni dei casi di infezione di questi microrganismi, causa di elevata mortalità e costi per la Sanità pubblica <sup>2</sup>.

Nella figura 1 sono raffigurati i dati raccolti dal *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sulla situazione in Europa riguardo le *Enterobacteriaceae* CRE, in particolare *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. 16 dei 37 Paesi partecipanti presentano

una diffusione regionale o interregionale di questi batteri, 4 una situazione endemica, tra cui l'Italia <sup>2</sup>.



**Figura 1.** Epidemiologia di CRE nei paesi Europei nel 2018 <sup>2</sup>.

Questo fenomeno può essere spiegato dalla pressione selettiva che si è sviluppata con il largo impiego negli ospedali dei carbapenemi contro i batteri produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL), che ha portato quindi alla comparsa di CRE. I trattamenti contro questi batteri sono molto limitati, soprattutto perché quelli che sembrano essere efficaci *in vitro* (colistina, fosfomicina e tigeciclina), spesso non lo sono *in vivo*, oltre all'aver numerosi effetti collaterali. La colistina è l'antibiotico più utilizzato contro i CRE, sebbene siano già emerse resistenze anche contro di essa; nel 2015 si sono infatti scoperti geni di resistenza su plasmidi. I batteri resistenti a tutti gli antibiotici, i pandrug-resistant CRE, sono oggi un serio problema, che spingono alla ricerca di nuovi farmaci e associazioni di essi <sup>2</sup>.

### 1.1 Le $\beta$ -lattamasi

I  $\beta$ -lattamici sono un gruppo ampio e molto utilizzato di antibiotici, caratterizzati dalla presenza di un anello  $\beta$ -lattamico in grado di interferire con la sintesi del peptidoglicano. Questi farmaci agiscono da falsi substrati per gli enzimi PBP (proteine che legano le

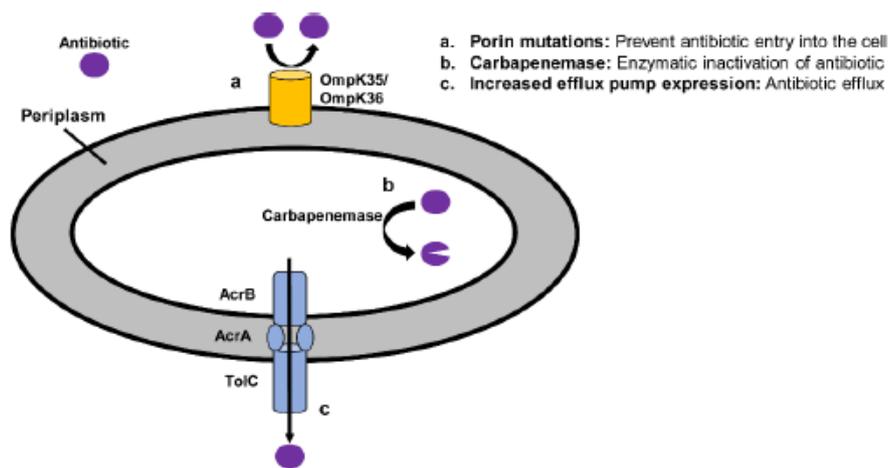
penicilline) presenti sul lato esterno della membrana, inattivandoli. In base alla struttura chimica, sono suddivisi in: penicilline (come Amoxicillina e Oxacillina), cefalosporine (come Ceftazidime e Cefepime), monobattami (Aztreonam) e carbapenemi (come Ertapenem, Meropenem, Imipenem) <sup>3</sup>.

Alcuni batteri risultano resistenti a questi antibiotici grazie alla produzione di enzimi chiamati  $\beta$ -lattamasi, codificati da uno o più geni *bla* presenti a livello plasmidico o cromosomiale, e possono essere inducibili o costitutivi. Ad oggi, sono state scoperte oltre 2000  $\beta$ -lattamasi diffuse in tutto il mondo <sup>4</sup>, differenziabili secondo diversi aspetti, ma che sono accumulate dalla caratteristica di idrolizzare l'anello  $\beta$ -lattamico di tali antibiotici. La prima classificazione fu proposta nel 1968 da Sawai et al. in penicillinasi e cefalosporinasi a seconda del substrato su cui agiscono. Un'altra modalità in cui è possibile classificare le  $\beta$ -lattamasi è a seconda della presenza nel sito attivo di uno ione metallico (metallo  $\beta$ -lattamasi) o di un residuo di serina (serina  $\beta$ -lattamasi) <sup>4</sup>. La classificazione più accettata però, che riprende quelle precedenti, è quella di Ambler, che distingue quattro classi molecolari indicate con le lettere da A a D <sup>5</sup>. Le classi A, C e D presentano serina  $\beta$ -lattamasi, mentre la classe B comprende le metallo  $\beta$ -lattamasi.

- **Classe A.** Sono comprese anche  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL), che conferiscono resistenza a cefalosporine di II e III generazione, e sono ad esempio TEM, SHV, CTX-M e GES <sup>4</sup>, e le serina-carbapenemasi (KPC). Conferiscono resistenza a penicilline, carbapenemi, cefalosporine e monobattami <sup>6</sup>. Altri esempi di  $\beta$ -lattamasi di classe A sono VEB, PER, SME, IMI e FRI.
- **Classe B (MBLs).** Sono metallo  $\beta$ -lattamasi che utilizzano un cofattore enzimatico metallico (solitamente  $Zn^{2+}$ ); sono efficaci contro penicilline, cefalosporine e carbapenemi ma non interferiscono con i monobattami; inoltre la loro azione viene inibita da chelanti metallici come EDTA <sup>6</sup>. A questa classe appartengono anche alcune carbapenemasi come VIM, IMP e NDM.
- **Classe C.** Sono indicate anche cefalosporinasi (ad esempio, AmpC) che agiscono contro penicilline e cefalosporine. Possono avere anche una debole capacità carbapenemasi, che può portare alla resistenza se unita a modificazioni delle porine o delle pompe di efflusso <sup>4</sup>
- **Classe D.** Sono definite anche OXA- $\beta$ -lattamasi o oxacillinasi poiché idrolizzano più efficacemente le isossazolil-penicilline. In questo gruppo sono incluse alcune carbapenemasi (es. OXA-48).

## 1.2 Meccanismi di resistenza ai carbapenemi

I meccanismi di resistenza ai carbapenemi delle *Enterobacteriaceae* sono principalmente 3: degradazione enzimatica tramite produzione di carbapenemasi, incrementata espressione di pompe di efflusso e mutazioni delle porine<sup>7</sup>. Altri meccanismi possibili sono la produzione di *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) o una maggiore espressione di enzimi AmpC-like. Questi meccanismi possono anche coesistere, ma quello con maggiore rilevanza clinica e più frequente è la produzione di carbapenemasi<sup>4</sup>.



**Figura 2.** Illustrazione dei principali meccanismi di resistenza ai carbapenemi delle *Enterobacteriaceae*<sup>7</sup>.

Gli enzimi carbapenemasi che si riscontrano più frequentemente sono KPC, NDM, OXA-48, VIM e IMP. La loro diffusione è così ampia data la posizione a livello plasmidico dei geni da cui sono codificati, risultando facilmente trasmissibili per coniugazione, anche tra batteri di specie diversa, soprattutto quelli ubiquitari come le *Enterobacteriaceae*<sup>4,7</sup>. Carbapenemasi come SME, invece, sono codificate a livello cromosomico dal gene *bla<sub>SME</sub>*, e quindi trasmissibili solo “verticalmente”<sup>4</sup>. Le prime famiglie di carbapenemasi plasmidiche ad emergere furono IMP nel 1990 in Giappone e VIM nel 1996 in Italia, e fecero da campanello d’allarme per una pandemia di batteri multiresistenti. Le famiglie di VIM e IMP iniziarono ad espandersi negli anni 2000, causando epidemie in aree ridotte del mondo. Diversamente, nei primi anni 2000 venne identificata la prima KPC plasmidica, che si è resa responsabile delle

epidemie di CPE in tutto il mondo, portando anche a numerose varianti. Nel 2001 venne indentificata in Turchia un'altra carbapenemasi plasmidica, OXA-48, in grado di idrolizzare, seppur lentamente, gli antibiotici carbapenemi e le cefalosporine a spettro esteso, e che è scarsamente inibita dagli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi. Oggi è diffusa nelle regioni del Mediterraneo e nell'Europa meridionale. Nel 2009 a New Delhi (India) è stata indentificata un'altra carbapenemasi plasmidica, chiamata NDM, che si è diffusa velocemente in tutto il mondo <sup>4</sup>.

### **1.3 Scopo della ricerca**

Nell'ambito della resistenza antimicrobica, particolare importanza riveste la diffusione globale di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE), i quali si distinguono da quelli resistenti ai carbapenemi (CRE) per il diverso meccanismo che sta alla base della resistenza.

I ceppi CPE infatti sono resistenti ai carbapenemi grazie alla produzione di carbapenemasi, enzimi specifici in grado di idrolizzare l'anello  $\beta$ -lattamico, la struttura alla base di questi antibiotici. La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri (CRE) invece è un concetto più ampio; essa può essere dovuta sia alla produzione di carbapenemasi, ma anche ad altri meccanismi spesso in associazione tra loro, come l'iperproduzione di  $\beta$ -lattamasi AmpC, la produzione di ESBL, la perdita o la modificazione delle proteine della membrana esterna e la sovrapproduzione di pompe di efflusso.

In particolare, in molte *Enterobacteriaceae* l'espressione di AmpC, generalmente è a livello basilare, ma è inducibile in risposta all'esposizione ai  $\beta$ -lattamici, o può essere iper-espressa a seguito di mutazioni nei geni che ne controllano l'induzione <sup>8</sup>. I  $\beta$ -lattamici hanno diverse capacità di induzione: ad esempio amoxicillina e alcune cefalosporine sono forti induttori e buoni substrati per AmpC; cefoxitina e imipenem sono forti induttori ma sono molto più stabili all'idrolisi; ceftazidime, cefepime e aztreonam invece sono deboli induttori e substrati, ma possono essere idrolizzati se viene prodotto abbastanza enzima. Paradossalmente, anche un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi come l'acido clavulanico può aumentare la resistenza dovuta ad un enzima AmpC inducibile <sup>8</sup>. Molto importanti per la resistenza agli antibiotici sono anche le pompe di efflusso e le porine: la diminuzione del numero dei canali d'ingresso o l'aumento dell'espressione delle pompe di efflusso, possono portare all'aumento dell'efficienza enzimatica <sup>8</sup>.

Lo scopo di questa tesi è stato studiare una collezione di ceppi di *Enterobacteriaceae* che erano stati isolati da campioni fecali. Tutti gli isolati erano resistenti ad almeno un carbapenemico (classificabili per l'appunto come CRE) ma non dimostravano la produzione di carbapenemasi. Di questi ceppi è stato studiato il resistotipo, mediante procedure di analisi fenotipiche, e successivamente si sono ricercati i possibili geni *bla* responsabili di tale profilo di resistenza. A completamento i ceppi sono stati analizzati mediante procedure di genotipizzazione allo scopo di evidenziarne l'eventuale correlazione genetica.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Ceppi batterici

In questo studio sono stati analizzati alcuni ceppi batterici raccolti da un precedente screening, effettuato nel 2018 presso la sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, volto alla ricerca di batteri appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi da campioni fecali provenienti dall'Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti" di Ancona. Tutti i campioni ottenuti dallo screening erano stati identificati mediante i metodi biochimici API 20E ed Enterosystem 24R ed analizzati per la produzione di carbapenemasi ed il fenotipo di resistenza. Con l'eccezione dei ceppi di *Klebsiella pneumoniae*, già studiati in precedenza, tutti gli altri isolati enterobatteri sono stati selezionati per la caratterizzazione fenotipica e genetica. La collezione in esame comprende 31 isolati distinti nelle seguenti specie: 8 *Escherichia coli*, 3 *Morganella morganii*, 2 *Proteus mirabilis*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Hafnia alvei*, 1 *Citrobacter freundii*, 2 *Enterobacter aerogenes* e 13 *Enterobacter* spp. Prima di procedere è stata eseguita la conferma dell'identificazione tramite il sequenziamento del gene codificante la subunità ribosomiale 16S con l'utilizzo dei primer universali 341 F e 907 R ed il sequenziatore AbiPrism della SOD di Virologia. La sequenza ha consentito di ottenere una ri-classificazione dei ceppi che erano stati indicati *Enterobacter* spp. I 13 ceppi sono stati così rinominati "ECC: *Enterobacter cloacae* complex" comprendenti le specie *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* ed *E. nimipressuralis*, in base ai recenti criteri di classificazione per cui le specie appartenenti all'ECC presentano il 61-67% di omologia del DNA genomico di queste specie con quello di *E. cloacae*<sup>9</sup>. I due ceppi di *E. aerogenes* sono stati riclassificati *Klebsiella aerogenes*, in accordo con la nuova assegnazione tassonomica pubblicata nel 2019<sup>10</sup>. Per lo sviluppo di questa tesi sono stati analizzati i 13 ceppi di ECC e i 2 ceppi di *K. aerogenes*, come riassunto nella tabella 2.

| Specie | Ceppi   |
|--------|---------|
| ECC    | 72134   |
| ECC    | 69988-1 |
| ECC    | 57327   |
| ECC    | 511724  |

|                     |          |
|---------------------|----------|
| ECC                 | 77871    |
| ECC                 | 36740-A  |
| ECC                 | 42112    |
| ECC                 | 33690-A  |
| ECC                 | 33690-B  |
| ECC                 | 79342    |
| ECC                 | 517735-1 |
| ECC                 | 69874    |
| ECC                 | 527838   |
| <i>K. aerogenes</i> | 70082-AS |
| <i>K. aerogenes</i> | 70082-AR |

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

## 2.2 Terreni di coltura e principali soluzioni utilizzate

I terreni di coltura utilizzati in questo studio per la crescita, l'isolamento e la determinazione della sensibilità agli antibiotici provengono dalla ditta OXOID (Garbagnate, MI).

**MacConkey Agar (MC)** → terreno selettivo per i Gram-negativi e differenziale. È un terreno selettivo perché in grado di inibire la crescita dei batteri Gram-positivi grazie alla presenza di Sali biliari e Cristalvioletto, e differenziale perché il lattosio come unica fonte di carbonio e il rosso neutro come indicatore di pH, permettono di distinguere batteri lattosio fermentanti e non-fermentanti. I primi presentano colonie rosa/viola con un'area di precipitazione dei Sali biliari, mentre i secondi presentano colonie incolori o trasparenti.

**Mueller Hinton Agar (MHA)** → terreno non selettivo e non differenziale, composto da estratto di carne, idrolizzato acido di caseina, amido e agar. È standardizzato per l'esecuzione dei test di sensibilità dei batteri agli antibiotici con il metodo della disco-diffusione.

**Mueller Hinton II Brodo (CAMHB)** → terreno liquido composto da estratto di carne, idrolizzato acido di caseina, amido e addizionato con ioni calcio e magnesio, con basse concentrazioni di timina e timidina. Utilizzato per l'esecuzione dei test di sensibilità agli antibiotici con il metodo della microdiluizione in brodo (Minima Concentrazione Inibente).

**Brain Heart Infusion Brodo (BHB)** → terreno liquido nutritivo non selettivo, utilizzato per la crescita e il mantenimento delle colture batteriche più esigenti. Contiene infuso di cuore e cervello di origine bovina o suina, cloruro di sodio, glucosio e sodio fosfato bifasico.

**BH + Glicerolo** → terreno adatto alla conservazione dei ceppi batterici, che avviene nelle apposite provette con tappo a vite alla temperatura di  $-70^{\circ}\text{C}$  anche per lunghi periodi di tempo. Le colture pure vengono prelevate tramite un tampone sterile e stemperate in 1 ml di BH+Glicerolo al 20%.

**Tris-Acetato-EDTA (TAE)** → tampone di corsa impiegato nell'elettroforesi su gel di agarosio per la separazione degli acidi nucleici. Viene preparata una soluzione di lavoro a concentrazione 1X a partire da una soluzione madre a concentrazione 50X. Di seguito sono riportati i componenti.

TAE 50X – Soluzione Stock

|                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| Tris base                  | 242 g                  |
| EDTA 0,5 M pH 8            | 100 ml                 |
| Acido Acetico Glaciale     | 57,1 ml                |
| H <sub>2</sub> O ultrapura | fino a raggiungere 1 L |

**Tris-Borato-EDTA (TBE)** → tampone di corsa impiegato nella PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Dato il maggiore potere tamponante del TBE rispetto al TAE, si ottiene una risoluzione migliore ed è adatto anche all'applicazione di un voltaggio superiore. Viene preparata una soluzione di lavoro alla concentrazione 0,5X a partire dalla concentrazione 10X a pH 8,3. Di seguito sono riportati i componenti.

TBE 10X- Soluzione Stock

|                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| Tris base                  | 107,81 g               |
| EDTA                       | 3,72 g                 |
| Acido borico               | 55,04 g                |
| H <sub>2</sub> O ultrapura | fino a raggiungere 1 L |

## 2.3 Determinazione del resistotipo

La determinazione del profilo di resistenza agli antibiotici dei ceppi batterici in esame, ovvero il resistotipo, è stato ottenuto applicando le seguenti procedure.

### 2.3.1 Antibiogramma

La valutazione qualitativa della sensibilità agli antibiotici è stata eseguita tramite il metodo della disco-diffusione in agar, secondo le direttive dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)<sup>11</sup>.

#### *Procedimento*

1. Si prepara una coltura pura seminando i ceppi sul terreno MC e lasciandoli in incubazione overnight a 37°C;
2. Si prelevano sterilmente delle colonie, si stemperano in CAMHB e si effettuano opportune diluizioni in modo da ottenere un inoculo standardizzato con densità ottica 0,1 misurata a 625 nm, che corrisponde a circa  $1 \times 10^8$  Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml);
3. Con un tampone sterile si distribuisce uniformemente l'inoculo sulla superficie di una piastra di MHA;
4. Si applicano sterilmente i dischetti dei vari antibiotici e si pone la piastra in incubazione overnight a 37°C in aerobiosi.

Gli antibiotici saggiati sono riportati nella tabella 3, con i relativi valori di breakpoint <sup>12</sup>.

| Antibiotico                            | Concentrazione dischetto (µg) | Zone diameter breakpoint (mm) |      |
|--|-------------------------------|-------------------------------|------|
|  |                               | S                             | R    |
| Amoxicillina + Acido clavulanico (AUG) | 20 + 10                       | ≥ 19                          | < 19 |
| Ceftazidime (CAZ)                      | 10                            | ≥ 22                          | < 19 |
| Cefotaxime (CTX)                       | 5                             | ≥ 20                          | < 17 |
| Cefepime (FEP)                         | 30                            | ≥ 27                          | < 24 |
| Aztreonam (ATM)                        | 30                            | ≥ 26                          | < 21 |
| Imipenem (IPM)                         | 10                            | ≥ 22                          | < 19 |
| Meropenem (MER)                        | 10                            | ≥ 22                          | < 16 |

|                                   |            |      |      |
|-----------------------------------|------------|------|------|
| Ertapenem (ETP)                   | 10         | ≥ 25 | < 25 |
| Ciprofloxacina (CIP)              | 5          | ≥ 25 | < 22 |
| Trimetoprim-Sulfametoxazolo (SXT) | 1.25-23.75 | ≥ 14 | < 11 |
| Cloramfenicolo (CHL)              | 30         | ≥ 17 | < 17 |
| Gentamicina (GEN)                 | 10         | ≥ 17 | < 17 |
| Amikacina (AK)                    | 30         | ≥ 18 | < 18 |

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

### 2.3.2 Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il metodo della microdiluizione in brodo è stato utilizzato per saggiare la sensibilità dei ceppi in esame agli antibiotici Aztreonam (ATM), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Ertapenem (ETP), Meropenem (MER), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GEN), Amikacina (AK), Cloramfenicolo (CHL) e Colistina (COL) in accordo con le procedure standardizzate EUCAST.

#### *Procedimento*

1. Per ogni antibiotico si prepara in CAMHB una soluzione alla concentrazione doppia rispetto a quella più alta da testare.
2. Per le sospensioni batteriche si procede come descritto in precedenza per ottenere l'inoculo standardizzato ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) il quale viene ulteriormente diluito 1:100 in modo da ottenere una concentrazione finale in ogni pozzetto della microtiter di  $5 \times 10^5$  UFC/ml;
3. Si preparano le microtiter in sterilità sotto cappa: in ogni pozzetto verranno dispensati 50 µl di CAMHB ad eccezione della prima colonna; 100 µl di antibiotico, precedentemente preparato, nella prima colonna, dalla quale verranno eseguite delle diluizioni scalari 1:2 fino alla penultima; e 50 µl di sospensione batterica;
4. Si incubano le microtiter a 37°C per 18-24h e si leggono i risultati: il valore di minima concentrazione inibente (MIC) è dato dalla più bassa concentrazione di antibiotico in cui non è visibile la crescita batterica.

L'interpretazione dei dati ottenuti è stata eseguita secondo i valori di breakpoint forniti dall'EUCAST <sup>12</sup>, riportati di seguito nella tabella 4.

| Antibiotico          | MIC breakpoints (mg/L) |       |
|----------------------|------------------------|-------|
|                      | S                      | R     |
| Colistina (COL)      | ≤ 8                    | > 8   |
| Cefepime (FEP)       | ≤ 1                    | > 4   |
| Aztreonam (ATM)      | ≤ 1                    | > 4   |
| Imipenem (IPM)       | ≤ 2                    | > 4   |
| Meropenem (MER)      | ≤ 2                    | > 8   |
| Ertapenem (ETP)      | ≤ 0,5                  | > 0,5 |
| Ciprofloxacina (CIP) | ≤ 0,25                 | > 0,5 |
| Cloramfenicolo (CHL) | ≤ 8                    | > 8   |
| Gentamicina (GEN)    | ≤ 2                    | > 2   |
| Amikacina (AK)       | ≤ 8                    | > 8   |

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

## 2.4 Determinazione del resistoma e tipizzazione genomica

La determinazione dei geni di resistenza (resistoma) agli antibiotici  $\beta$ -lattamici è stata eseguita con le tecniche di PCR e PCR multiplex illustrate di seguito, la cui applicazione prevede l'estrazione del DNA dei ceppi batterici. La tipizzazione genomica invece è stata ottenuta tramite la metodica di PFGE, anch'essa illustrata in seguito.

### 2.4.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA genomico consiste nel separare l'acido nucleico da tutti gli altri componenti cellulari, che potrebbero interferire con le analisi successive. Il DNA dei ceppi in esame è stato ottenuto utilizzando il sistema di estrazione e purificazione GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA-ALDRICH St Louis, MO), seguendo le indicazioni specifiche per i Gram negativi fornite dalla ditta produttrice.

*Procedimento:*

1. Prelevare da una coltura pura, con l'ausilio di un tampone sterile, una modesta quantità di colonie batteriche e stemperarle in 1,5 ml di soluzione fisiologica;
2. Centrifugare per 2 minuti a 12.000-16.000 x g ed eliminare il surnatante;
3. Risospendere il pellet in 180 µl di Lysis Solution T, fornita pronta all'uso nel kit;
4. Aggiungere 20 µl di RNasi A Solution ed incubare a temperatura ambiente per 2 minuti;
5. Aggiungere 20 µl della soluzione di Proteinasi K (20.000 µg/ml), mescolare e incubare a 55°C per 30 minuti;
6. Unire 200 µl di Lysis Solution C, vortexare per 15 secondi e incubare a 55 °C per 10 minuti;
7. Assemblare la colonnina fornita dal kit con una Eppendorf da 2 ml e aggiungere 500 µl di Column Preparation Solution, centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto e scartare l'eluito. Questo passaggio è importante per massimizzare il legame del DNA con la colonnina.
8. Aggiungere 200 µl di etanolo al 95-100% al lisato e vortexare per 5-10 secondi;
9. Trasferire l'intero volume di lisato nella colonna preparata precedentemente, centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluito trasferendo la colonnina in una nuova eppendorf da 2 ml;
10. Effettuare il primo lavaggio con 500 µl di Wash Solution 1, centrifugando a 12.000 x g per 1 minuto e scartando l'eluito;
11. Eseguire il secondo lavaggio con 500 µl di Wash Solution Concentrate, centrifugando alla massima velocità per 3 minuti, per poi eliminare l'eluito;

12. Centrifugare nuovamente la colonnina alla massima velocità per 1 minuto in modo da eliminare eventuali residui di Wash Solution, trasferendo poi la colonnina in una nuova eppendorf da 2 ml;
13. Aggiungere 200 µl di Elution Solution e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per aumentare l'efficienza dell'eluizione, poi centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto.
14. Eliminare la colonnina e conservare l'eluato finale contenente il DNA genomico purificato. Conservare a -20 °C.

#### 2.4.2 Tecniche di PCR e PCR multiplex

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di amplificazione genica che permette di ottenere rapidamente milioni di copie identiche di DNA a partire da una quantità iniziale molto ridotta di acido nucleico, che funge da stampo. Lo strumento necessario per eseguire questa tecnica è il termociclatore, in grado di alternare 3 temperature diverse (di denaturazione, annealing e polimerizzazione) per un numero di cicli  $n$  che variano a seconda dei protocolli che si stanno seguendo.

##### *Applicazione della PCR e PCR multiplex*

In questo studio la PCR è stata applicata per la ricerca, nei ceppi batterici in esame, dei geni *bla* riportati nella tabella N, suddivisi nelle classi di Ambler di appartenenza 1980)<sup>5</sup>. Tra questi geni, KPC, VIM, IMP, NDM e OXA-48 sono le principali classi di carbapenemasi.

| <b>GENI <i>bla</i> RICERCATI</b> |          |          |          |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| <b>A</b>                         | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> |
| TEM                              | VIM      | MOX      | OXA-1    |
| SHV                              | IMP      | FOX      | OXA-48   |
| CTX-M                            | NDM      | ACC      |          |
| KPC                              |          | CMY      |          |
| GES                              |          | DHA      |          |
| VEB                              |          | ACT      |          |
| PER                              |          | MIR      |          |
| SME                              |          |          |          |

**Tabella 5.** Geni *bla* ricercati tramite PCR.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nelle condizioni di tempo e temperatura riportate nella letteratura di riferimento <sup>13-16</sup> utilizzando i primer illustrati nella tabella N e la DreamTaq della ditta Thermo Fisher Scientific. L'elenco completo dei componenti utilizzati, delle rispettive concentrazioni e volumi finali è riportato in seguito:

| Componente                                   | Concentrazione finale                  | Volume finale  |
|--|--|--|
| DNA genomico                                 | non standardizzata                     | 2 µl   |
| Buffer 10X                                   | 1X                                     | 5 µl   |
| Primers                                      | <i>vedi letteratura di riferimento</i> | <i>dipende dalla concentrazione richiesta in letteratura</i> |
| dNTP   | 200 µM                                 | 1 µl   |
| DreamTaq                                     | 1 U                                    | 0,2 µl   |
| H <sub>2</sub> O MilliQ sterile e DNasi free |  | fino ad arrivare a 50 µl                                     |

| Gene bla | Primer         | Sequenza 5' – 3'       | Dimensione (bp) | Bibliografia       |
|----------|----------------|------------------------|-----------------|--------------------|
| TEM      | MultiTSO-T_for | CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC | 800             | Dallenne 2010      |
|          | MultiTSO-T_rev | CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC |                 |                    |
| SHV      | MultiTSO-S_for | AGCCGCTTGAGCAAATTAAC   | 713             |                    |
|          | MultiTSO-S_rev | ATCCCGCAGATAAATCACCAC  |                 |                    |
| OXA-1    | MultiTSO-O_for | GGCACCAGATTCAACTTTCAAG | 564             |                    |
|          | MultiTSO-O_rev | GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG |                 |                    |
| CTX-M    | CTX MU1        | ATGTGCAGYACCAGTAARGT   | 593             | Pagani 2003        |
|          | CTX MU2        | TGGGTRAARTARGTSACCAGA  |                 |                    |
| GES      | MultiGES_for   | AGTCGGCTAGACCGGAAAG    | 399             | Dallenne 2010      |
|          | MultiGES_rev   | TTTGTCCGTGCTCAGGAT     |                 |                    |
| VEB      | MultiVEB_for   | CATTTCCCGATGCAAAGCGT   | 648             |                    |
|          | MultiVEB_rev   | CGAAGTTTCTTTGGACTCTG   |                 |                    |
| PER      | MultiPER_for   | GCTCCGATAATGAAAGCGT    | 520             |                    |
|          | MultiPER_rev   | TTCGGCTTGACTCGGCTGA    |                 |                    |
| VIM      | VIM F          | GATGGTGTGGTTCGCATA     | 390             | Poirel et al. 2011 |
|          | VIM R          | CGAATGCGCAGCACCAG      |                 |                    |
| IMP      | IMP F          | GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC | 232             |                    |
|          | IMP R          | GGTTTAAAYAAAACAACCACC  |                 |                    |
| NDM      | NDM F          | GGTTTGGCGATCTGGTTTTC   | 621             | Poirel et al.      |

|                     |                 |                        |     |                     |
|---------------------|-----------------|------------------------|-----|---------------------|
|                     | NDM R           | CGGAATGGCTCATCACGATC   |     | 2011                |
| OXA-48              | OXA F           | GCGTGGTTAAGGATGAACAC   | 438 |                     |
|                     | OXA R           | CATCAAGTTCAACCCAACCG   |     |                     |
| KPC                 | KPC Fm          | CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG   | 798 |                     |
|                     | KPC Rm          | CTTGTCATCCTTGTTAGGCG   | 232 |                     |
| SME                 | SME-F           | AACGGCTTCATTTTTGTTTAG  | 831 | Meunier<br>JAC_2017 |
|                     | SME-R           | GCTTCCGCAATAGTTTTATCA  |     |                     |
| ACC                 | MultiCaseACCfor | CACCTCCAGCGACTTGTTAC   | 346 | Dallenne<br>2010    |
|                     | MultiCaseACCrev | GTTAGCCAGCATCACGATCC   |     |                     |
| FOX                 | MultiCaseFOXfor | CTACAGTGCGGGTGGTTT     | 162 |                     |
|                     | MultiCaseFOXrev | CTATTTGCGGCCAGGTGA     |     |                     |
| MOX/<br>CMY         | MultiCaseMOXfor | GCAACAACGACAATCCATCCT  | 895 |                     |
|                     | MultiCaseMOXrev | GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA |     |                     |
| DHA                 | MultiCaseDHAfor | TGATGGCACAGCAGGATATTC  | 997 |                     |
|                     | MultiCaseDHArev | GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG |     |                     |
| LAT/<br>BIL/<br>CMY | MultiCaseCITfor | CGAAGAGGCAATGACCAGAC   | 538 |                     |
|                     | MultiCaseCITrev | ACGGACAGGGTTAGGATAGY   |     |                     |
| ACT-1/<br>MIR-1     | MultiCaseEBCfor | CGGTAAAGCCGATGTTGCG    | 683 |                     |
|                     | MultiCaseEBCrev | AGCCTAACCCCTGATACA     |     |                     |

**Tabella 6.** Primer utilizzati per la ricerca dei vari geni *bla*

#### 2.4.3 Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel è una tecnica che permette di separare macromolecole di acido nucleico in base al diverso peso molecolare tramite l'applicazione di un campo elettrico. Il DNA è carico negativamente, perciò si sposta verso il polo positivo (anodo) a velocità variabili in modo inversamente proporzionale al peso molecolare dei diversi frammenti. Questo è possibile grazie al setaccio molecolare creato dall'agarosio di cui è composto il gel. I frammenti separati vengono visualizzati utilizzando intercalanti della doppia elica di DNA, mentre un marker con frammenti di dimensioni note è necessario per risalire alla dimensione dei frammenti in esame.

L'elettroforesi in questo studio è stata condotta su un gel di agarosio a concentrazioni variabili dall'1 al 2% a seconda di quanto è richiesto dalla procedura applicando un voltaggio costante di 80 V per circa 30-40 minuti. I componenti necessari e la procedura applicata sono riportati in seguito.

### ***Gel di agarosio al 2%***

- 2 g di agarosio (Agarose D-1 LE Standard for Molecular Biology- Fisher Molecular Biology)
- 100 ml di TAE 1X
- 300 µl di GreenGel (Società Italiana Chimici): molecola fluorescente intercalante del DNA che permette di visualizzare le bande al transilluminatore ad UV.

### ***Marker: 5 µl***

- Marker (100 bp Plus): marcatore molecolare composto da frammenti di dimensioni note con un range di 100-3000 bp che permette di valutare la qualità della corsa e la dimensione dei frammenti amplificati.

### ***Loading Dye: 2 µl***

- TriTrack DNA Loading Dye (6X) - Thermo Fisher Scientific: miscela che permette di visualizzare l'andamento della corsa e facilita la deposizione del campione nel pozzetto del gel.

### ***Procedura***

1. Preparare il gel pesando l'agarosio e scioglierlo nel TAE, riscaldando fino ad ottenere un composto limpido e trasparente;
2. Aggiungere il GelGreen e lasciar solidificare il gel nell'apposito sistema, applicando un pettine per creare i pozzetti;
3. Una volta solidificato, trasferire il gel nella vaschetta per elettroforesi contenente il tampone di corsa TAE 1X;
4. Caricare il marker, poi caricare i prodotti di amplificazione mescolando 10 µl di campione con 2 µl di Loading Dye;
5. Chiudere il coperchio della cella per l'elettroforesi e attivare il sistema impostando un voltaggio costante a 80 V;
6. Al termine della corsa, visualizzare il risultato al transilluminatore UV.

#### 2.4.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE è una particolare tecnica di elettroforesi che permette di separare frammenti di DNA di dimensioni maggiori (10–800 kb) rispetto alla classica elettroforesi, grazie all'applicazione di un campo elettrico che cambia ripetutamente direzione. L'angolo compreso tra gli elettrodi e la velocità di questo cambiamento sono determinati dai valori di *switch time*, *field angle* e *ramping factor*. I frammenti si ottengono dalla digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione, e la loro posizione dopo la corsa forma il cosiddetto “*Dna fingerprint*” perchè è specifica per ogni clone di ogni specie.<sup>17</sup>. L'intera procedura è stata eseguita secondo il protocollo del CDC “Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*”. Il DNA di tutti i campioni è stato digerito con 40 U dell'enzima di restrizione **XbaI** (Sigma-Aldrich), che riconosce e taglia la sequenza 5'-T ↓CTAGA-3'.

##### *Materiali*

##### **TE buffer**

10 mM Tris

1 mM EDTA pH 8.0

Acqua sterile ultrapura

##### **Cell Suspension Buffer**

100 mM Tris

100 mM EDTA pH 8.0

Acqua sterile ultrapura

##### **Cell Lysis Buffer**

50 mM Tris

50 mM EDTA pH 8.0

1% Sarcosyl

##### **Gel di agarosio**

- 1 % low melting-point agarose (Bio-Rad, Hercules, California, USA) per la preparazione delle plugs ( $T_{\text{melt}}$  65°C)

- 1 % Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)

##### **TBE 0,5 X**

## **Procedura**

### *Preparazione delle plugs*

1. Da una coltura O/N si preleva sterilmente una piccola quantità di colonie e si sospende in 2 ml di Suspension Buffer;
2. Standardizzare gli inoculi misurando la densità ottica a 610 nm come illustrato precedentemente;
3. Aggiungere alla sospensione batterica 400 µl di low melting-point agarose, agitare e prelevare 100 µl da inserire nell'apposito stampino "plug mold" per creare le plugs.

### *Lisi cellulare*

4. Quando sono ben solidificate, si trasferiscono le plugs in una provetta contenente 5 ml di Lysis buffer e 25 µl di proteinasi K (20 µg/ml) e si lasciano in incubazione a 55°C per 2 ore;
5. Effettuare 2 lavaggi con 5 ml di acqua sterile ultrapura e 4 con TE Buffer, entrambi pre-riscaldati a 55°C;
6. Dopo l'ultimo lavaggio, lasciare le plug in 5-10 ml di TE buffer.

### *Digestione enzimatica con Xba I*

7. Preparare in una eppendorf da 2 ml il buffer specifico, l'enzima e l'acqua sterile, poi aggiungere circa metà plug;
8. Incubare a 37°C per 1 ora e mezza.

### *Preparazione del gel*

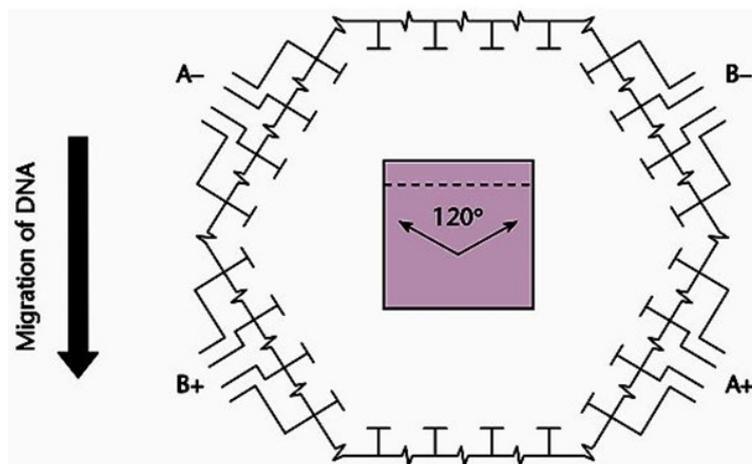
9. Far aderire il marker, contenente frammenti di DNA da 50 a 1000 kb (ProMega-Markers Lambda Ladders, USA), e le plugs sul "pettine" di supporto, con l'ausilio di una piccola quantità di low melting-point agarose;

10. Posizionare il pettine nell'apposito sistema e versare delicatamente il gel Pulsed Field Certified Agarose all'1% precedentemente preparato, in modo che le plugs vengano inglobate nel gel prima che si solidifichi;
11. Rimuovere il pettine quando il gel è ben solidificato.

### *Corsa elettroforetica*

In questo studio le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchiatura CHEF MAPPER XA SYSTEM (Bio-Rad) collegato ad una pompa refrigerante che manteneva la temperatura del TBE 0,5X a circa 14 °C. I valori impostati per la corsa sono i seguenti:

- field angle: 120°
- tempo: 22 ore
- initial switch time: 2,2 secondi
- final switch time: 54,2 secondi
- ramping factor: lineare
- 200 V



**Figura 3.** Illustrazione dello schema della PFGE

### *Lettura finale*

La visualizzazione delle bande è stata effettuata al transilluminatore ad UV dopo aver lasciato colorare il gel in Etidio Bromuro 0,5 µg/ml per 30 minuti. L'interpretazione del profilo di bande ottenuto, secondo i criteri della PFGE, segue la classificazione riportata nella seguente tabella <sup>18</sup>.

| <b>Categoria</b>        | <b>N. di frammenti differenti</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Indistinguibili         | 0                                 |
| Strettamente correlati  | 2-3                               |
| Possibilmente correlati | 4-6                               |
| Differenti              | $\geq 7$                          |

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Sensibilità agli antibiotici

##### 3.1.1 Antibiogramma

I valori misurati dei diametri dell'alone di inibizione sono stati convertiti in "Resistente (R)", "Non sensibile (NS)" o "Sensibile (S)" in base alle direttive dell'EUCAST <sup>12</sup>. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

| Ceppo    | Antibiotici $\beta$ -lattamici |     |     |       |     |     |     |     | Antibiotici non $\beta$ -lattamici |     |     |     |    |
|----------|--------------------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|-----|-----|----|
|          | Carbapenemi                    |     |     | Altri |     |     |     |     | CIP                                | SXT | CHL | GEN | AK |
|          | ETP                            | MER | IPM | AUG   | CAZ | CTX | FEP | ATM |                                    |     |     |     |    |
| 72134    | R                              | NS  | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 69988-1  | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 57327    | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | R                                  | R   | S   | S   | S  |
| 511724   | R                              | S   | NS  | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 77871    | R                              | S   | NS  | R     | R   | R   | S   | R   | R                                  | R   | S   | S   | S  |
| 36740-A  | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | R                                  | R   | S   | S   | S  |
| 42112    | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 33690-A  | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 33690-B  | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 79342    | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 517735-1 | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 69874    | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | NS  | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 527838   | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | R   | R   | S                                  | S   | S   | S   | S  |
| 70082-AS | R                              | S   | S   | R     | R   | R   | NS  | R   | S                                  | S   | S   | S   | R  |
| 70082-AR | R                              | S   | R   | R     | R   | R   | NS  | NS  | S                                  | S   | S   | S   | R  |

**Tabella 7.** Profili di resistenza da antibiogramma.

##### 3.1.2 MIC

La Tabella 8 seguente riporta i risultati di MIC ottenuti interpretati in accordo con i valori di *breakpoint* dell'EUCAST <sup>12</sup>.

| Ceppo   | Antibiotici $\beta$ -lattamici |           |           |         |          | Antibiotici non $\beta$ -lattamici |                 |         |                 |        |
|---------|--------------------------------|-----------|-----------|---------|----------|------------------------------------|-----------------|---------|-----------------|--------|
|         | Carbapenemi                    |           |           | Altri   |          | CIP                                | GEN             | AK      | COL             | CHL    |
|         | ETP                            | MER       | IPM       | FEP     | ATM      |                                    |                 |         |                 |        |
| 72134   | 16 (R)                         | 4 (NS)    | 1 (S)     | >16 (R) | > 16 (R) | $\leq 0,25$ (S)                    | $\leq 0,25$ (S) | 0,5 (S) | 1 (S)           | 16 (R) |
| 69988-1 | 4 (R)                          | 0,25 (S)  | 0,5 (S)   | 4 (R)   | > 16 (R) | $\leq 0,25$ (S)                    | $\leq 0,25$ (S) | 2 (S)   | $\leq 0,25$ (S) | 8 (S)  |
| 57327   | 8 (R)                          | 0,5/1 (S) | 1 (S)     | 2(NS)   | > 16 (R) | $\leq 0,25$ (S)                    | $\leq 0,25$ (S) | 1 (S)   | 2 (S)           | 4 (S)  |
| 511724  | > 16 (R)                       | 2 (S)     | 1 (S)     | 2 (NS)  | > 16 (R) | $\leq 0,25$ (S)                    | $\leq 0,25$ (S) | 1 (S)   | 2 (S)           | 4 (S)  |
| 77871   | 4 (R)                          | 0,25      | 0,5/1 (S) | 0,5 (S) | 16 (R)   | $\leq 0,25$                        | $\leq 0,25$     | 1       | 0,5 (S)         | 8 (S)  |

|          |        |          |              |           |          |           |           |         |           |       |
|----------|--------|----------|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|---------|-----------|-------|
|          |        | (S)      |              |           |          | (S)       | (S)       | (S)     |           |       |
| 36740-A  | 8 (R)  | 0,5 (S)  | 0,25/0,5 (S) | 2 (NS)    | > 16 (R) | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 0,5 (S) | 0,25 (S)  | 4 (S) |
| 42112    | 16 (R) | 2 (S)    | 0,25 (S)     | 4 (NS)    | 16 (R)   | ≤0,25 (S) | 0,5 (S)   | 1 (S)   | 0,25 (S)  | 4 (S) |
| 33690-A  | 8 (R)  | 2 (S)    | 0,25 (S)     | 4 (NS)    | 16 (R)   | ≤0,25 (S) | 0,5 (S)   | 2 (S)   | 0,25 (S)  | 4 (S) |
| 33690-B  | 8 (R)  | 0,5 (S)  | 0,25 (S)     | 8 (R)     | > 16 (R) | ≤0,25 (S) | 0,5 (S)   | 2 (S)   | 0,125 (S) | 8 (S) |
| 79342    | 8 (R)  | 0,25 (S) | 0,125 (S)    | 4 (NS)    | > 16 (R) | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 1 (S)   | 2 (S)     | 8 (S) |
| 517735-1 | 16 (R) | 0,5 (S)  | 0,125 (S)    | 4 (NS)    | > 16 (R) | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 1 (S)   | 0,25 (S)  | 4 (S) |
| 69874    | 4 (R)  | 1 (S)    | 1 (S)        | ≤0,25 (S) | 4 (NS)   | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 1 (S)   | 1 (S)     | 4 (S) |
| 527838   | 8 (R)  | 1 (S)    | 0,5 (S)      | 0,5 (S)   | > 16 (R) | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 1 (S)   | 2 (S)     | 4 (S) |
| 70082-AS | 2 (R)  | 1 (S)    | 1 (S)        | ≤0,25 (S) | 4 (NS)   | ≤0,25 (S) | 0,5 (S)   | 4 (S)   | 0,25 (S)  | 4 (S) |
| 70082-AR | 2 (R)  | 0,5 (S)  | 2 (S)        | ≤0,25 (S) | 16 (R)   | ≤0,25 (S) | ≤0,25 (S) | 1 (S)   | 0,5 (S)   | 4 (S) |

**Tabella 8.** Risultati della MIC

I risultati ottenuti mediante le due procedure di determinazione della sensibilità agli antibiotici stati elaborati e combinati nella tabella 9 riassuntiva sottostante che illustra il resistotipo dei 15 ceppi in esame.

| Ceppo    | Antibiotici β-lattamici |             |             |             |             |             |             |             | Antibiotici non β-lattamici |             |             |             |        |             |
|----------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|--------|-------------|
|          | Carbapenemi             |             |             | Altri       |             |             |             |             | C<br>I<br>P                 | S<br>X<br>T | C<br>H<br>L | G<br>E<br>N | A<br>K | C<br>O<br>L |
|          | E<br>T<br>P             | M<br>E<br>R | I<br>P<br>M | A<br>U<br>G | C<br>A<br>Z | C<br>T<br>X | F<br>E<br>P | A<br>T<br>M |                             |             |             |             |        |             |
| 72134    | R                       | NS          | S           | R           | R           | R           | R           | R           | S                           | S           | R           | S           | S      | S           |
| 69988-1  | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 57327    | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | R                           | R           | S           | S           | S      | S           |
| 511724   | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 77871    | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | S           | R           | R                           | R           | S           | S           | S      | S           |
| 36740-A  | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | R                           | R           | S           | S           | S      | S           |
| 42112    | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 33690-A  | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 33690-B  | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | R           | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 79342    | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 517735-1 | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | NS          | R           | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |
| 69874    | R                       | S           | S           | R           | R           | R           | S           | NS          | S                           | S           | S           | S           | S      | S           |

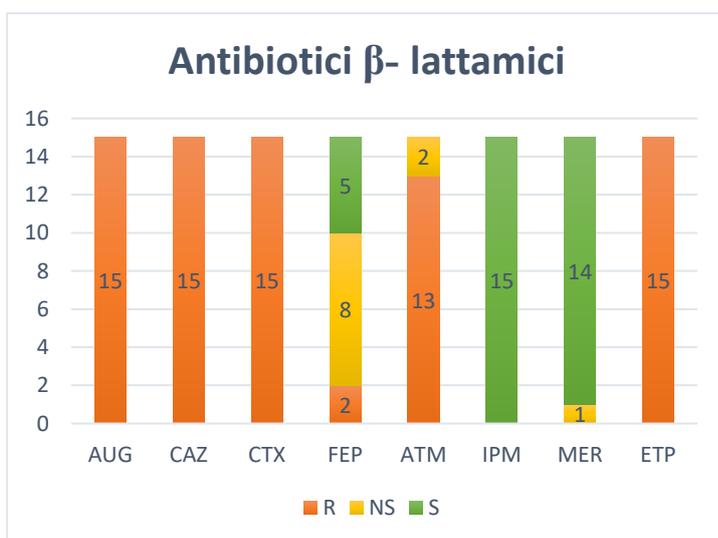
|          |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|
| 527838   | R | S | S | R | R | R | S | R  | S | S | S | S | S | S |
| 70082-AS | R | S | S | R | R | R | S | NS | S | S | S | S | S | S |
| 70082-AR | R | S | S | R | R | R | S | R  | S | S | S | S | S | S |

**Tabella 9.** Resistotipo dei 15 ceppi ECC. Per una migliore visione generale dei risultati le categorie di interpretazione sono state distinte in colori diversi.

Dai dati ottenuti dopo l'esecuzione dell'antibiogramma e della MIC sui ceppi in esame, è emerso che tutti risultano resistenti ad amoxicillina- acido clavulanico (AUG), alle cefalosporine a spettro esteso di III generazione ceftazidime (CAZ) e cefotaxime (CTX), mentre per quelle di IV generazione cefepime (FEP), 5 sono risultati sensibili, 8 non sensibili e 2 resistenti. Nessun ceppo è risultato sensibile ad aztreonam (ATM). Per quanto riguarda gli antibiotici carbapenemi, tutti sono risultati resistenti ad ertapenem (ETP), sebbene con valori di MIC variabili (MIC range, 2 - >16 mg/ml), e sensibili ad imipenem (IPM) e meropenem (MER), ad eccezione del 72134 non sensibile a MER (MIC, 4 mg/ml).

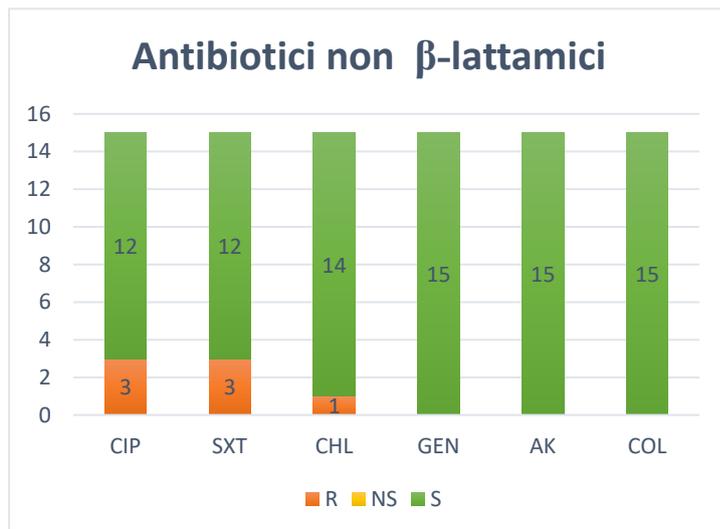
Gli antibiotici non  $\beta$ -lattamici mantengono la loro attività all'incirca su tutti i ceppi in esame, ad eccezione del 72134 che risulta resistente (MIC, 16 mg/ml) al cloramfenicolo (CHL) e di 3 ceppi che sono resistenti a basso livello alla ciprofloxacina (CIP) (MIC range, 2-4 mg/ml) e trimetoprim-sulfametoxazolo (SXT) (nessun alone di inibizione evidenziato).

La rielaborazione di questi dati ha permesso di costruire i seguenti grafici.



**Grafico 1.**

Grafico di confronto tra i diversi antibiotici  $\beta$ -lattamici e il comportamento dei ceppi in esame, espresso in valore assoluto.



**Grafico 2.**

Grafico di confronto tra i diversi antibiotici non β-lattamici e il comportamento dei ceppi in esame, espresso in valore assoluto.

### 3.2 Resistoma

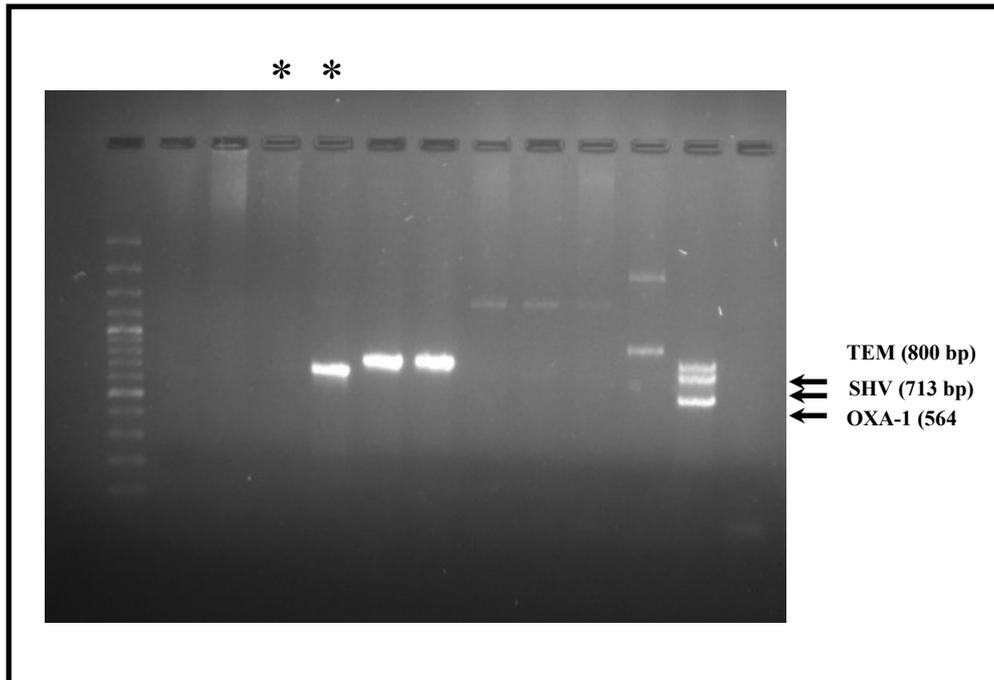
Applicando le tecniche di PCR e PCR Multiplex precedentemente descritte ed utilizzando primer di letteratura<sup>13-16</sup> sono stati ottenuti i seguenti risultati, riassunti nella tabella 10 sottostante.

| Specie       | Ceppo    | Beni <i>bla</i> individuati (classi di Ambler) |   |     |   |
|--------------|----------|--|---|-----|---|
|              |          | A  | B | C   | D |
| ECC          | 72134    | -  | - | -   | - |
| ECC          | 69988-1  | -  | - | -   | - |
| ECC          | 57327    | -  | - | -   | - |
| ECC          | 511724   | -  | - | -   | - |
| ECC          | 77871    | -  | - | -   | - |
| ECC          | 36740-A  | -  | - | ACT | - |
| ECC          | 42112    | -  | - | ACT | - |
| ECC          | 33690-A  | -  | - | -   | - |
| ECC          | 33690-B  | -  | - | -   | - |
| ECC          | 79342    | -  | - | -   | - |
| ECC          | 517735-1 | -  | - | -   | - |
| ECC          | 69874    | -  | - | -   | - |
| ECC          | 527838   | SHV  | - | -   | - |
| K. aerogenes | 70082-AS | -  | - | -   | - |
| K. aerogenes | 70082-AR | -  | - | -   | - |

**Tabella 10.** Tabella riassuntiva dei geni *bla* individuati

Analizzando le immagini ottenute dopo elettroforesi si è osservato che solo due isolati *ECC* (36740-A e 42112) erano positivi per il gene *bla*<sub>ACT</sub>, uno dei numerosi geni plasmidici codificante per una β-lattamasi AmpC-like, che appartiene alla classe C di Ambler. Un solo

ceppo (ECC 527838) era positivo per il gene *bla<sub>SHV</sub>*, che codifica per una  $\beta$ -lattamasi appartenente alla classe A di Ambler (Figura 4). Tutti i ceppi si sono confermati negativi per la ricerca dei geni di carbapenemasi (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>*) e non sono stati individuati i geni codificanti per  $\beta$ -lattamasi più diffusi come TEM, CTX-M-15 e OXA-1 (riferimento Tabella 5).



**Figura 4.** Elettroforesi dopo PCR Multiplex per TEM-SHV-OXA-1<sup>13</sup>. L'asterisco (\*) indica il risultato di due ceppi ECC (69874, 527838); gli altri campioni presenti nell'immagine non sono oggetto di questo studio. Il controllo positivo (C+) è un ceppo di *Escherichia coli* (CP-Ec 267757) che contiene tutti i tre geni.

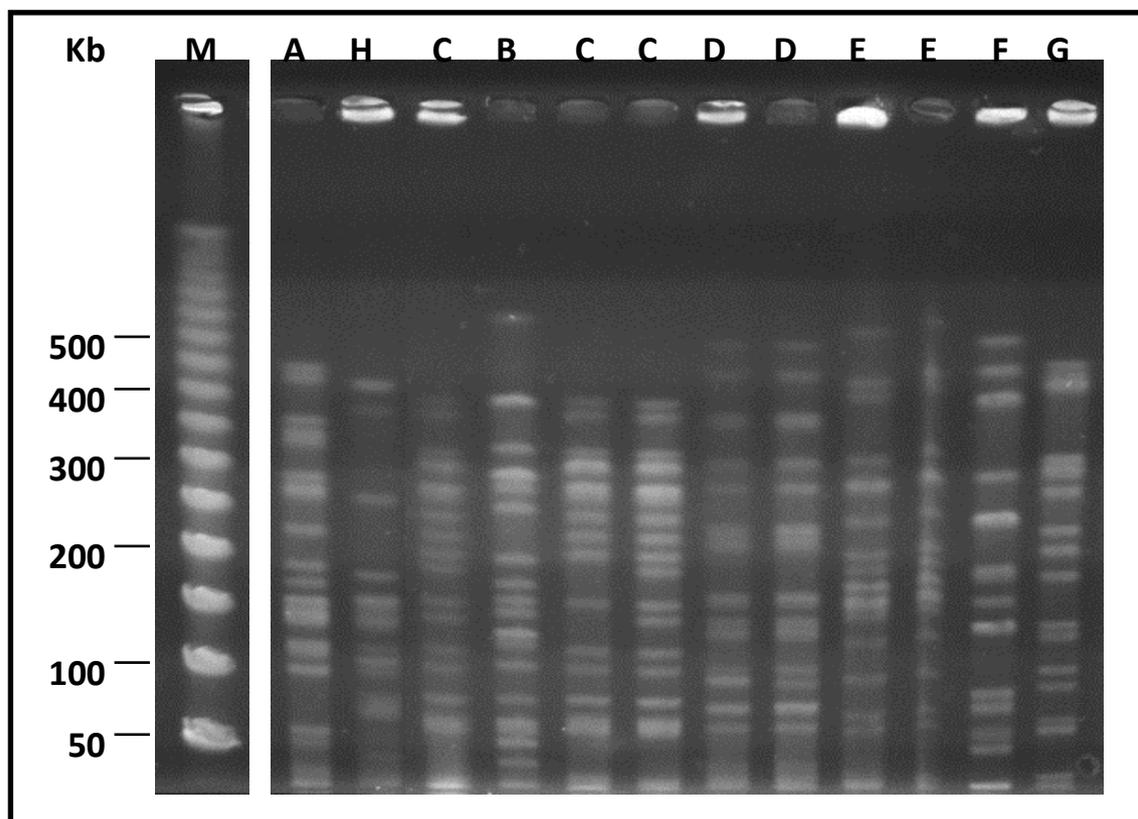
### 3.3 Pulsotipo- *Xba*I PFGE

I profili ottenuti per tutti i 15 isolati ECC mediante la procedura di genotipizzazione *Xba*I-PFGE sono stati interpretati applicando i criteri di Tenover<sup>18</sup>. Si sono riscontrati 12 diversi pulsotipi, osservabili nelle immagini 5 e 6 e riassunti nella tabella 11. Il ceppo 57327 e il 36740 A sono indistinguibili (pulsotipo C), e sono strettamente correlati con il 77871 (pulsotipo C1). Profili identici sono stati ottenuti anche con i ceppi 42112 e 33690 A (pulsotipo D) e 79342 e 517735-1 (pulsotipo E), che sono strettamente correlati al 33690-B

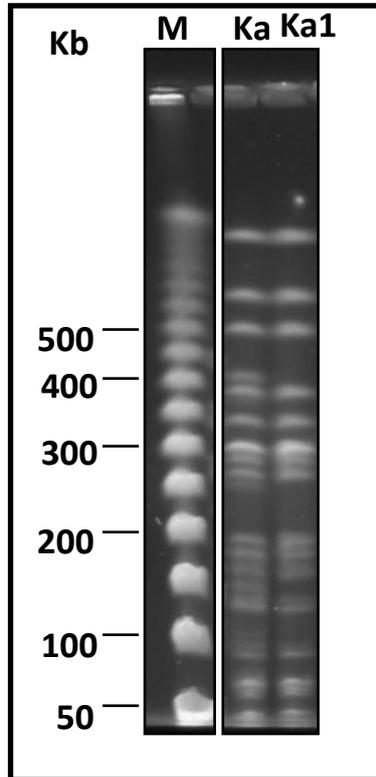
(pulsotipo E1). I due ceppi di *Klebsiella aerogenes* sono strettamente correlati. I campioni restanti, 72134, 511724, 69874 e 527838 sono profili distinti da tutti gli altri (*singletons*).

| Specie              | Ceppo    | Pulsotipo (XbaI-PFGE) |
|---------------------|----------|-----------------------|
| <i>ECC</i>          | 72134    | A                     |
| <i>ECC</i>          | 69988-1  | H                     |
| <i>ECC</i>          | 57327    | C                     |
| <i>ECC</i>          | 511724   | B                     |
| <i>ECC</i>          | 77871    | C1                    |
| <i>ECC</i>          | 36740-A  | C                     |
| <i>ECC</i>          | 42112    | D                     |
| <i>ECC</i>          | 33690-A  | D                     |
| <i>ECC</i>          | 33690-B  | E1                    |
| <i>ECC</i>          | 79342    | E                     |
| <i>ECC</i>          | 517735-1 | E                     |
| <i>ECC</i>          | 69874    | F                     |
| <i>ECC</i>          | 527838   | G                     |
| <i>K. aerogenes</i> | 70082-AS | Ka                    |
| <i>K. aerogenes</i> | 70082-AR | Ka1                   |

**Tabella 11.** Tabella riassuntiva dei pulsotipi ottenuti



**Immagine 10.** Profili di restrizione degli ECC ottenuti tramite PFGE dopo digestione con XbaI. Il ceppo 33690-B (non presente nell'immagine) è stato analizzato in un esperimento supplementare.



**Immagine 11.** Profili di restrizione di *K. aerogenes* dopo digestione con XbaI e corsa su PFGE.

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio il genere *Enterobacter* ha assunto una tale importanza tra i patogeni nosocomiali da entrare a far parte del gruppo degli ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter spp*)<sup>19</sup>, cioè il gruppo dei più importanti patogeni nosocomiali antibiotico-resistenti. Nel genere *Enterobacter*, gli ECC sembrano essere la causa del 65-75% delle infezioni ospedaliere<sup>20</sup> e insieme ad *E. aerogenes* rappresentano i batteri più frequentemente isolati nelle infezioni di pazienti immunocompromessi o ricoverati in terapia intensiva<sup>10</sup>. Risultano così il terzo gruppo di batteri multi-resistenti, dopo *E. coli* e *K. pneumoniae*, riscontrati nelle infezioni nosocomiali<sup>21</sup>.

Destano preoccupazione perché spesso risultano fenotipicamente MDR, con la capacità di acquisire facilmente geni di resistenza su plasmidi<sup>22</sup> da altri batteri. Inoltre, gli ECC presentano a livello cromosomico dei geni che codificano per una  $\beta$ -lattamasi AmpC, prodotta quindi costitutivamente, che li rende intrinsecamente resistenti ad ampicillina, amoxicillina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalosporine di I e II generazione (cefotaxima); sono generalmente sensibili a fluorochinoloni, trimetoprim-sulfametossazolo, cloramfenicolo, aminoglicosidi, tetracicline, piperacillina-tazobactam e ai carbapenemi<sup>9</sup>.

Questi microrganismi sono anche in grado di regolare la trascrizione della  $\beta$ -lattamasi cromosomica AmpC, portando ad un'aumentata espressione, o acquisendo geni AmpC-like plasmidici. Quest'ultimi sono piuttosto diffusi e conferiscono resistenza anche alle cefalosporine di III generazione, carbossipenicilline, ureidopenicilline e non sensibilità ai comuni inibitori delle  $\beta$ -lattamasi.

Secondo studi recenti vi è alta prevalenza, tra gli ECC, di ceppi produttori di ESBL, risultando così resistenti anche alle cefalosporine di IV generazione<sup>9</sup>. Non solo sono in grado di produrre ESBL, ma anche  $\beta$ -lattamasi con azione carbapenemasi, portando così ad una difficoltà nel trattamento di infezioni da tali ceppi, sebbene la resistenza ai carbapenemi è spesso una combinazione di fattori: iperproduzione di enzimi AmpC-like o ESBL in associazione con un'alterata permeabilità del farmaco nella cellula<sup>9</sup>.

Inizialmente sensibili, gli ECC hanno acquisito nel tempo la resistenza ai fluorochinoloni (come la ciprofloxacina), largamente utilizzato per trattare le infezioni da *Enterobacteriaceae*, modificando il bersaglio di tali antibiotici<sup>9</sup>.

| Antibiotic class | Resistance type                       | Resistance mechanism  | Enzyme type         | Species   |
|------------------|---------------------------------------|---|---------------------|---|
| β-lactams        | Enzymatic degradation (β-lactamases)  | Ambler class A  | TEM, SHV, CTX-M     | <i>Enterobacter cloacae</i> ,<br><i>Enterobacter hormaechei</i> |
|                  |                                       |   | VEB, GES/IBC, KPC   | <i>E. cloacae</i>   |
|                  |                                       |   | NMC-A, IMI-1, IMI-2 | <i>E. cloacae</i> ,<br><i>Enterobacter asburiae</i>             |
|                  |                                       | Ambler class B  | VIM                 | <i>E. cloacae</i> ,<br><i>Enterobacter ludwigii</i>             |
|                  |                                       |   | IMP, NDM-1          | <i>E. cloacae</i>   |
| Ambler class C   | Amp-C, ACT-1                          | <i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> ,<br><i>E. hormaechei</i> ,<br><i>Enterobacter kobei</i> |                     |   |
| Ambler class D   | OXA-48                                | <i>E. cloacae</i>   |                     |   |
| Fluoroquinolones | Plasmid-mediated quinolone resistance | Acetyltransferase   | AAC(6′)-Ib-cr       | <i>E. cloacae</i>   |
|                  |                                       | Qnr-mediated topoisom protection  | Qnr (A, B, S, C, D) | <i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i>                        |
|                  |                                       | Efflux-pump   | QepA                | <i>E. cloacae</i>   |
| Aminoglycosides  | Enzymatic modification                | Acetyltransferase   | AAC(6′)-Ib          | <i>E. cloacae</i>   |
| Tigecycline      | Target overproduction                 | Efflux pump   | AcrAB               | <i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i>                        |

**Figura 7.** Tabella riassuntiva dei meccanismi di antibiotico resistenza degli ECC. <sup>9</sup>

Confrontando queste informazioni con i risultati della nostra ricerca è possibile non solo confermare la resistenza costitutiva degli ECC, ma anche la presenza di ulteriori meccanismi, data la resistenza alle cefalosporine di III generazione e all’ertapenem. Nei ceppi 36740-A e 42112 è stato riscontrato il gene *bla<sub>ACT</sub>*, che codifica per una AmpC di origine plasmidica, che può spiegare la resistenza alle cefalosporine di III generazione. È importante sottolineare che i livelli di espressione dei geni di origine plasmidica che codificano per ACT-1 sono molto più elevati rispetto all’AmpC cromosomiale, grazie ad un numero superiore di copie dei geni e una maggiore forza del promotore <sup>8</sup>. Una sua iperproduzione, insieme a modifiche dei sistemi di permeabilità, potrebbe essere alla base della resistenza all’ertapenem.

Nel ceppo 527838 è stata riscontrata la presenza del gene *bla<sub>SHV</sub>*, che codifica per una ESBL (classe A di Ambler) che sembra essere alla base della resistenza ad aztreonam e alle cefalosporine a spettro esteso CAZ e CTX. Anche in questo caso, una sua iperproduzione e modifiche di membrana, potrebbe essere una spiegazione per la resistenza al carbapenemico ertapenem.

La resistenza degli altri ceppi, nei quali non si è rilevato alcun gene *bla* tra quelli ricercati, potrebbe essere dovuta ad altri geni mobili non ricercati, o a mutazioni geniche cromosomiche che non sono state studiate in questa tesi.

Per quanto riguarda *E. aerogenes*, in confronto agli ECC, le infezioni causate da questa specie mostrano una maggiore mortalità (39% dei pazienti) perché le infezioni sfociano spesso in shock settico <sup>10</sup>. La produzione della  $\beta$ -lattamasi AmpC cromosomiale è generalmente bassa, ma una sua iperproduzione conduce alla resistenza a tutti i  $\beta$ -lattamici eccetto cefepime e carbapenemici. Questo profilo di resistenza è dato anche dalle AmpC plasmidiche. Sono stati isolati numerosi ceppi produttori di ESBLs, appartenenti soprattutto alle famiglie di TEM, SHV e CTX. La resistenza ai carbapenemi è associata prevalentemente alla modifica dell'espressione delle porine, e nel 40% dei casi di MDR anche un'elevata attività delle pompe di efflusso <sup>10</sup>. Dal momento che in nessuno dei due ceppi di *K. aerogenes* sono stati riscontrati i geni *bla* ricercati, possiamo solamente ipotizzare la presenza di altri geni o delle modifiche delle porine e pompe di efflusso.

#### **4.1 Conclusioni**

Questo studio ci ha permesso di individuare solo alcuni dei meccanismi di resistenza dei 15 ceppi in esame, dato che abbiamo ricercato solamente i più comuni geni *bla* plasmidici conosciuti. I risultati ottenuti rappresentano un punto di partenza per la ricerca di altri geni associati e lo studio degli altri meccanismi molecolari associati con la resistenza ai carbapenemi.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F. *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS*. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
2. *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae-Second Update Event Background Current Situation of CRE in EU/EEA Countries.*; 2019.
3. Rossi F., Cuomo V., Riccardi C. *Farmacologia per Le Professioni Sanitarie*.
4. Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18
5. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1980;289(1036). doi:10.1098/rstb.1980.0049
6. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(4). doi:10.1128/CMR.8.4.557
7. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 2019;8(2). doi:10.3390/antibiotics8020037
8. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(1):161-182. doi:10.1128/CMR.00036-08
9. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2012;7(7):887-902. doi:10.2217/fmb.12.61
10. 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
11. <https://eucast.org>.

12. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_11.0\\_Breakpoint\\_Tables](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables).
13. 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
14. 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
15. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(9):4264-4269. doi:10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003
16. Meunier D, Findlay J, Doumith M, et al. FRI-2 carbapenemase-producing Enterobacter cloacae complex in the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(9):2478-2482. doi:10.1093/jac/dkx173
17. Golding GR, Campbell J, Spreitzer D, Chui L. Pulsed-field gel electrophoresis of Staphylococcus aureus. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1301. doi:10.1007/978-1-4939-2599-5\_8
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R v, et al. *GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing*. Vol 33.; 1995.
19. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(8). doi:10.1086/533452
20. Sanders WE, Sanders CC. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(2). doi:10.1128/CMR.10.2.220
21. Zhou K, Yu W, Cao X, et al. Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated Enterobacter cloacae

complex in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(1). doi:10.1093/jac/dkx361

22. Ji Y, Wang P, Xu T, et al. Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Four species (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggenkampii*, and *Enterobacter kobei*) Belonging to *Enterobacter cloacae* Complex With Clinical Significance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11. doi:10.3389/fcimb.2021.677089

## **RINGRAZIAMENTI**

*Giunta al termine di questo percorso, non posso non ringraziare la mia relatrice, la Prof.ssa Marina Mingoia, per la disponibilità e l'attenzione che mi ha dedicato in questi mesi in laboratorio, e per la bellissima opportunità che mi ha concesso: la dedizione e la passione che mette nel suo lavoro sono stati per me d'esempio.*

*Vorrei ringraziare infinitamente la Dott.ssa Gloria Magi, la mia correlatrice, per la presenza costante al mio fianco in laboratorio, sempre pronta ad aiutarmi nei momenti di difficoltà, con la sua pazienza e gentilezza.*







