



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in**  
**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**PREVALENZA DI BATTERI RESISTENTI AI CARBAPENEMI IN**  
**CAMPIONI AMBIENTALI, ANIMALI E ALIMENTARI**

**PREVALENCE OF CARBAPENEM RESISTANT BACTERIA IN**  
**ENVIRONMENTAL, ANIMAL AND FOOD SAMPLES**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Norma Sartorelli

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa

Carla Vignaroli

Correlatore:

Dott.ssa Serena Simoni

**SESSIONE STRAORDINARIA**

**ANNO ACCADEMICO 2018/2019**

## INDICE

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Generalità sulle Enterobacteriaceae..</i>	<i>1</i>
<i>1.1.1 Escherichia coli.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Klebsiella.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2 Antibiotico – resistenza .</i>	<i>7</i>
<i>1.3 <math>\beta</math> – lattamasi e carbapenemasi.....</i>	<i>12</i>
<i>1.4 Diffusione delle Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi.....</i>	<i>22</i>
SCOPO DELLA TESI. ....	34
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI .....</b>	<b>35</b>
<i>2.1 Campionamento .....</i>	<i>35</i>
<i>2.2 Terreni di coltura .....</i>	<i>38</i>
<i>2.3 Processamento dei campioni.....</i>	<i>42</i>
<i>2.4 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).....</i>	<i>45</i>
<i>2.5 Test di Hodge Modificato.....</i>	<i>48</i>
<i>2.6 S1- PFGE .....</i>	<i>49</i>
<i>2.7 Estrazione DNA da sedimento .....</i>	<i>51</i>
<i>2.8 Estrazione del DNA da colture pure .....</i>	<i>53</i>

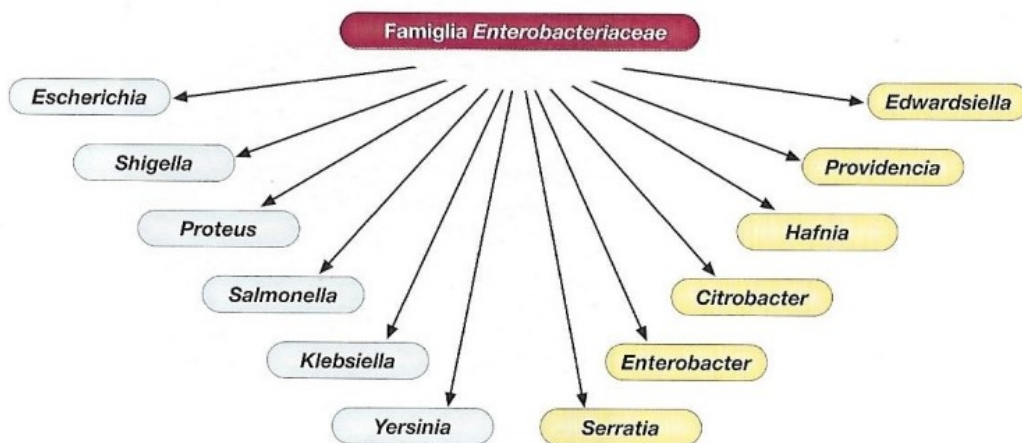
2.9	<i>Saggi di PCR per la ricerca di ceppi produttori di carbapenemasi</i> .....	55
2.10	<i>Purificazione, quantificazione e sequenziamento</i> .....	57
2.11	<i>Identificazione mediante sistema miniaturizzato</i> .....	60
<b>CAPITOLO 3: RISULTATI</b> .....		<b>62</b>
3.1	<i>Isolamento dei ceppi cresciuti su terreno selettivo</i> .....	62
3.1.1	<i>Determinazione della MIC</i> .....	62
3.1.2	<i>Risultati del Test di Hodge</i> .....	69
3.2	<i>Identificazione ed indagini molecolari</i> .....	71
3.3	<i>Risultati del sequenziamento</i> .....	75
3.4	<i>Ulteriori test di sensibilità</i> .....	86
<b>CAPITOLO 4: DISCUSSIONE</b> .....		<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....		<b>99</b>

# 1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

## *1.1 Generalità sulle Enterobacteriaceae*

Le *Enterobacteriaceae* rappresentano il gruppo più ampio ed eterogeneo di bacilli Gram-negativi di rilevante interesse medico. Sono agenti eziologici di una vasta gamma di patologie umane e comunemente sono la causa principale del 50% delle setticemie, del 70% delle infezioni urinarie comunitarie e della maggior parte delle infezioni intestinali. Le *Enterobacteriaceae* possono essere responsabili anche di meningite, shock endotossico, polmonite e molte altre patologie (Antonelli et al., 2008; Oliveira & Reygaert, 2019). Sono organismi asporigeni, aerobi/anaerobi facoltativi, mobili grazie alla presenza di flagelli peritrichi (tranne *Shigella* e *Klebsiella*), e generalmente provvisti di pili alle estremità dei quali sono presenti adesine per l'interazione con le cellule dei tessuti infettati. Le *Enterobacteriaceae* hanno esigenze nutrizionali semplici, fermentano il glucosio, riducono il nitrato, sono catalasi-positive e ossidasi-negative per l'assenza dell'enzima citocromo-c ossidasi, caratteristica utile per distinguerle da molti altri bacilli Gram-negativi (Antonelli et al., 2008). Alcune specie di questa grande famiglia sono patogene (come *Salmonella typhi*, *Shigella* spp. e *Yersinia pestis*), mentre altre come *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae* fanno parte della

normale flora commensale e possono causare infezioni opportunistiche (Figura 1.1). Dal punto di vista patogenetico inoltre, alcuni commensali intestinali appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* possono diventare patogeni quando acquisiscono geni che codificano per fattori di virulenza (come *E. coli* enteropatogeno) (Antonelli et al., 2008).



**Figura 1.1** Generi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* più importanti in patologia umana (Antonelli et al., 2008).

### ***1.1.1 Escherichia coli***

*Escherichia coli* è l'unica specie del genere *Escherichia* clinicamente importante; il suo habitat naturale è l'intestino dell'uomo e di molti altri animali, ed in questa sede è un comune commensale (Antonelli et al., 2008). È quindi normalmente innocuo, ma alcuni ceppi hanno acquisito una combinazione di elementi genetici mobili grazie ai quali sono in grado di causare una serie di patologie: da infezioni intestinali ed extraintestinali (per esempio infezioni del tratto urinario), a batteriemie o infezioni del sistema nervoso centrale (Matthew et al., 2010).

Dall'intestino, dove alberga normalmente, *E. coli* può colonizzare l'uretra con un meccanismo solitamente ascendente anche grazie alla sua mobilità per la presenza di flagelli peritrichi, fimbrie di tipo 1 e pili di tipo P che permettono l'adesione a recettori specifici (digalattoside) delle cellule uroepiteliali, impedendo l'eliminazione di *E. coli* da parte della peristalsi uretrale o dal flusso urinario (Matthew et al., 2010). I ceppi responsabili di tali patologie sono denominati ceppi uropatogeni (UPEC). Altri ceppi patogeni di *E. coli* sono responsabili di enteriti e gastroenteriti: gli enterotossigeni (ETEC, produttori di tossine termolabili e/o termostabili), gli enteropatogeni (EPEC), gli enteroemorragici (EHEC, produttori di tossine Shiga-like), gli enteroinvasivi (EIEC) e gli enteroaggregativi (EAEC) (Matthew et al., 2010).

La patogenicità di *E. coli* è determinata da geni che codificano per fattori di virulenza: questi spesso sono disposti in clusters e fanno parte di isole di patogenicità (PAI) integrate nel cromosoma batterico o nei plasmidi, e generalmente affiancate da elementi genetici mobili (quali batteriofagi, sequenze di inserzione o trasposoni); spesso si inseriscono vicino ai geni che codificano per i tRNA, e sono trasferibili mediante meccanismi di trasferimento genetico orizzontale (HGT) (Matthew et al., 2010).

*E. coli* fa parte dei cosiddetti coliformi, inclusi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, facenti parte della flora microbica normale e utilizzati come indicatori di contaminazione fecale delle acque per la loro elevata concentrazione nel materiale fecale umano e animale. I coliformi fecali, meglio definiti come coliformi termotolleranti, per la loro capacità di fermentare il lattosio anche a temperature più alte (44°C), sono un sottogruppo dei coliformi totali, più strettamente correlati al tratto intestinale degli animali a sangue caldo. Considerata l'elevata prevalenza della specie *E. coli* nell'ambito del gruppo dei coliformi fecali (90%), nonché l'esclusivo rapporto del microrganismo con il tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, *E. coli* meglio assolve il ruolo di microrganismo indicatore (<http://iss.it/>).

### ***1.1.2 Klebsiella pneumoniae***

I batteri del genere *Klebsiella* producono un'abbondante capsula polisaccaridica responsabile dell'aspetto mucoso delle colonie sui terreni di coltura e della virulenza del microrganismo *in vivo*. La specie di maggior interesse clinico è *Klebsiella pneumoniae* che comprende tre sottospecie: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozenae* (responsabile di una rinite atrofica detta ozena) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (responsabile di un'inflammatione naso-faringea detta rinoscleroma). La prima di queste sottospecie è frequentemente un commensale delle prime vie respiratorie e del tratto intestinale, ma si comporta da patogeno opportunisto, e come tale può essere responsabile di un gran numero di infezioni diverse: infezioni respiratorie e urinarie, otiti, sinusiti, meningiti e setticemie. La polmonite da *Klebsiella* frequentemente provoca necrosi degli spazi alveolari, formazione di cavità e produzione di escreato striato di sangue. Una seconda specie di isolamento clinico è *K. oxytoca* che presenta caratteristiche di patogenicità simili a quelle di *K. pneumoniae* (Antonelli et al., 2008).

Nel tempo, i ceppi di *K. pneumoniae* hanno sviluppato resistenza a diverse classi di antibiotici, limitando così le opzioni terapeutiche disponibili. La produzione di  $\beta$ -lattamasi di classe A rende il batterio intrinsecamente resistente alle penicilline e alle cefalosporine a spettro ristretto. Tuttavia in



Italia, dopo un periodo di sostanziale stabilità, negli ultimi due anni, è stata osservata una diminuzione significativa della percentuale di isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi (dal 36,7% nel 2016 al 30,0% nel 2018) e agli aminoglicosidi (dal 43,5% nel 2016 al 35,5% nel 2018), mentre la resistenza alle cefalosporine di terza generazione e ai fluorochinoloni si è mantenuta piuttosto stabile (entrambe intorno al 53% nel 2018). Anche la percentuale di ceppi con resistenze multiple, misurata come percentuale di resistenti alle tre classi di antibiotici (fluorochinoloni, cefalosporine di terza generazione e aminoglicosidi) è diminuita, e nel 2018 era intorno al 25%, molto più della simile alla media europea (intorno al 20%) (<http://iss.it/>) (Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>).

## ***1.2 Antibiotico-resistenza***

Gli antibiotici hanno rivoluzionato la medicina sotto molti aspetti, e grazie al loro utilizzo innumerevoli vite sono state salvate: la loro scoperta fu una svolta nella storia umana, ed è giustamente considerata uno dei più significativi eventi legati alla salute dei tempi moderni. Il primo antibiotico scoperto fu la penicillina nel 1928 ad opera di Alexander Fleming, ma già dal 1940, cioè qualche anno prima della sua effettiva introduzione nel mercato come agente terapeutico, una penicillinasi batterica (una  $\beta$ -lattamasi) fu identificata dallo stesso Fleming e dal suo team (Davies & Davies, 2010).

I batteri popolano la terra da milioni di anni, e durante tutto questo tempo sono venuti a contatto con una vasta gamma di agenti antimicrobici naturali contro i quali hanno dovuto difendersi per sopravvivere. Non sorprende pertanto, che siano diventati resistenti alla maggior parte degli agenti antimicrobici di derivazione naturale che sono attualmente in commercio (Demain & Sanchez, 2009). Infatti, dato che molti degli antibiotici utilizzati per la cura delle infezioni sono sintetizzati da microrganismi presenti nell'ambiente e nel suolo (ad esempio miceti), è chiaro che la funzione, in natura, di tali composti è quella di inibire i microrganismi competitori degli stessi produttori di antibiotici (Martinez et al., 2009).

In sostanza, le antibiotico-resistenze sono nate (o meglio i geni per la resistenza si sono evoluti) in un contesto ambientale e non clinico, ancor prima che l'uomo iniziasse ad utilizzare gli antibiotici a scopo terapeutico. Ovviamente, la loro introduzione a tale scopo risulta essere uno degli eventi più importanti nella storia della medicina, soprattutto per la riduzione di mortalità e morbilità causate dalle infezioni batteriche. Ma purtroppo il grande uso e soprattutto l'abuso di antibiotici sono stati la causa dell'insorgere di antibiotico-resistenze in molti patogeni umani, riducendo le possibilità di trattare molte infezioni come quelle che si sviluppano in seguito a procedure mediche, quali ad esempio impianti di protesi o trapianti. In questi interventi, in cui l'insorgenza di complicanze di natura infettiva non è rara, è infatti fondamentale la disponibilità di una terapia antibiotica efficace (Martinez et al., 2009).

Dopo 70 anni dalla loro introduzione nella pratica medica, milioni di tonnellate di antibiotici sono stati prodotti e impiegati per un'ampia varietà di scopi. I miglioramenti nella produzione hanno fornito inoltre sempre più composti meno costosi che hanno incoraggiato il loro utilizzo senza prescrizione medica ed il loro uso improprio. Il pianeta è saturo di questi composti antibiotici, il che ovviamente ha contribuito significativamente alla selezione di ceppi resistenti. Lo sviluppo di generazioni di microrganismi

resistenti agli antibiotici e la loro distribuzione nelle popolazioni microbiche di tutto il pianeta sono il risultato di molti anni di incessante pressione selettiva (Davies & Davies, 2010).

L'antibiotico-resistenza rappresenta anche un costo molto elevato per l'economia mondiale: per fare un esempio, soltanto negli USA si stima che annualmente muoiano circa 99.000 persone in seguito ad infezioni batteriche da ceppi antibiotico-resistenti acquisiti in ambito ospedaliero. Tali situazioni portano ad un aumento delle spese sanitarie soprattutto per i costi di degenza, poiché un paziente affetto da infezione nosocomiale, di media prolunga il ricovero fino ad almeno 13 giorni. In ambito ospedaliero le antibiotico-resistenze sono molto diffuse, a causa della pressione selettiva che l'ambiente ospedaliero stesso esercita sui microrganismi. Inoltre spesso i dispositivi medici utilizzati sui pazienti ricoverati (per es. cateteri vascolari e urinari) rappresentano dei substrati abiotici facilmente colonizzabili dai batteri. Sulla superficie di questi substrati i batteri formano delle complesse comunità, chiamate *biofilm*, difficili da eradicare e in grado di portare allo sviluppo di infezioni croniche o ricorrenti. Le cellule batteriche inglobate in un biofilm risultano infatti resistenti sia all'azione degli antibiotici, che ai meccanismi di difesa dell'ospite (macrofagi o anticorpi) (Aslam et al., 2018).

Molti dei patogeni batterici associati ad epidemie, si sono evoluti come resistenti a più farmaci, e quindi denominati *multi drug resistant* (MDR); in molti casi, tali ceppi multiresistenti hanno anche acquisito maggior virulenza ed una spiccata trasmissibilità, diventando un grave problema a livello globale. Alcuni ceppi MDR sono stati definiti *extensively drug resistant* (EDR), e *pandrug resistant* (PDR), cioè resistenti ad un gran numero di classi diverse di antibiotici o addirittura insensibili a qualsiasi antibiotico utilizzato in ambito clinico. Questi ceppi MDR sono anche definiti *superbugs*, microrganismi responsabili di alti tassi di mortalità e morbidità, proprio a causa della loro resistenza verso una vasta gamma di antibiotici (Davies & Davies, 2010).

I meccanismi di resistenza sviluppati dai microrganismi sono molteplici, e riguardano praticamente tutti gli antibiotici più comunemente utilizzati nella pratica clinica. Nella tabella che segue (Tabella 1.1) sono schematizzati i principali meccanismi di resistenza, ed i target dei vari antibiotici (Davies & Davies, 2010).

Antibiotic class	Example(s)	Target	Mode(s) of resistance
$\beta$ -Lactams	Penicillins (ampicillin), cephalosporins (cephamycin), penems (meropenem), monobactams (aztreonam)	Peptidoglycan biosynthesis	Hydrolysis, efflux, altered target
Aminoglycosides	Gentamicin, streptomycin, spectinomycin	Translation	Phosphorylation, acetylation, nucleotidylation, efflux, altered target
Glycopeptides	Vancomycin, teicoplanin	Peptidoglycan biosynthesis	Reprogramming peptidoglycan biosynthesis
Tetracyclines	Minocycline, tigecycline	Translation	Monooxygenation, efflux, altered target
Macrolides	Erythromycin, azithromycin	Translation	Hydrolysis, glycosylation, phosphorylation, efflux, altered target
Lincosamides	Clindamycin	Translation	Nucleotidylation, efflux, altered target
Streptogramins	Synercid	Translation	C-O lyase (type B streptogramins), acetylation (type A streptogramins), efflux, altered target
Oxazolidinones	Linezolid	Translation	Efflux, altered target
Phenicol	Chloramphenicol	Translation	Acetylation, efflux, altered target
Quinolones	Ciprofloxacin	DNA replication	Acetylation, efflux, altered target
Pyrimidines	Trimethoprim	C <sub>1</sub> metabolism	Efflux, altered target
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	C <sub>1</sub> metabolism	Efflux, altered target
Rifamycins	Rifampin	Transcription	ADP-ribosylation, efflux, altered target
Lipopeptides	Daptomycin	Cell membrane	Altered target
Cationic peptides	Colistin	Cell membrane	Altered target, efflux

**Tabella 1.1** Meccanismi di resistenza verso i più comuni antibiotici (Davies & Davies, 2010).

La resistenza ai carbapenemi, comparsa alla fine degli anni '90, dapprima in ceppi di *K. pneumoniae* e poi in altre *Enterobacteriaceae*, è una delle resistenze che desta maggiore preoccupazione. L'uso dei carbapenemi, considerati antibiotici di ultima istanza, viene infatti riservato proprio al trattamento di infezioni sostenute da batteri Gram-negativi multiresistenti. La rapida diffusione di ceppi produttori di carbapenemasi ha provocato quindi grande allarme tra i medici che in questi casi si trovano di fronte a scarsissime opzioni terapeutiche (Doi et al., 2015; Grundmann et al., 2017). I carbapenemi sono inclusi nella classe degli antibiotici  $\beta$ -lattamici che comprendono: penicilline, cefalosporine, monobattami, inibitori delle  $\beta$ -

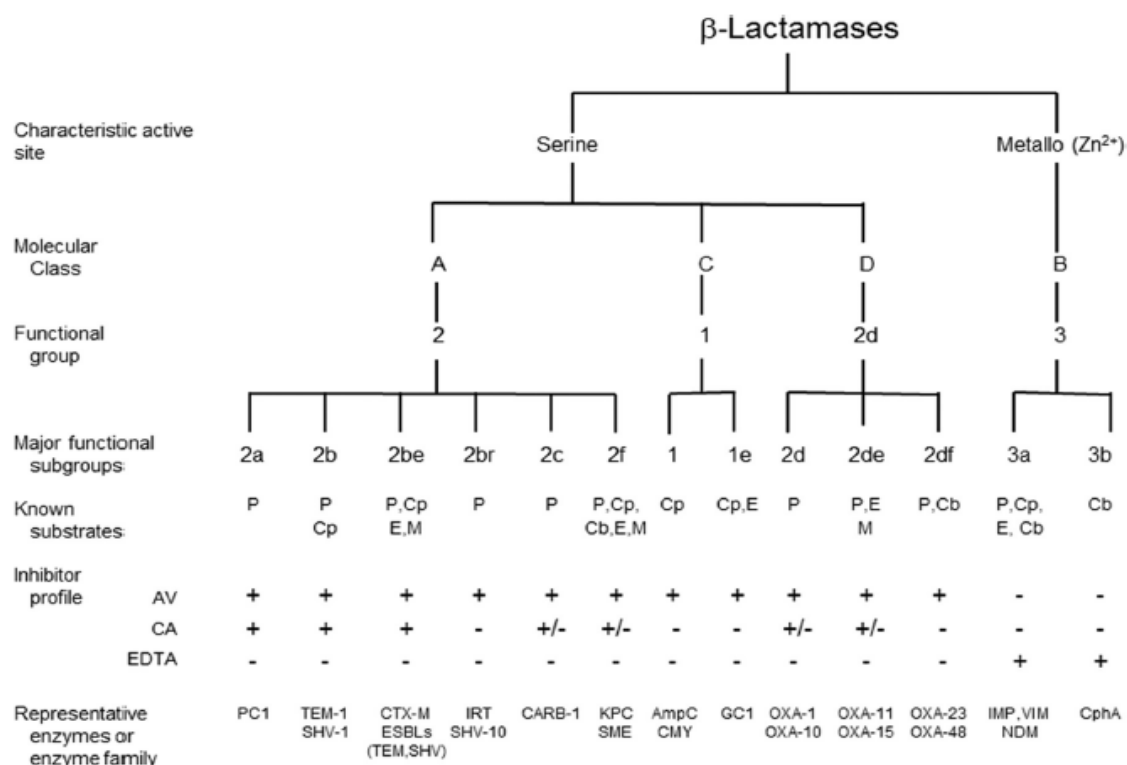
lattamasi (ad esempio acido clavulanico, sulbactam e tazobactam), e per l'appunto i carbapenemi. La caratteristica biochimica comune è quella di possedere un anello tetratomico  $\beta$ -lattamico, ovvero un'ammide ciclica (lattame) a 4 atomi di carbonio, che rappresenta il sito attivo. I carbapenemi presentano uno spettro d'azione più ampio rispetto agli altri  $\beta$ -lattamici e tra i più utilizzati ricordiamo: imipenem, meropenem, ertapenem, e doripenem (Pandey & Cascella, 2019).

### ***1.3 $\beta$ -lattamasi e carbapenemasi***

Le  $\beta$ -lattamasi sono enzimi prodotti da diversi microrganismi sia Gram-negativi che Gram-positivi che conferiscono ai batteri la resistenza verso gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, e le cui origini possono essere fatte risalire a milioni di anni fa. Di questi enzimi ormai ben studiati, se ne contano attualmente circa 2.800, e sembra che in origine siano evoluti in microrganismi ambientali, molto probabilmente come meccanismo di protezione dall'attacco di  $\beta$ -lattamici naturali (Bush, 2018). Le  $\beta$ -lattamasi catalizzano l'idrolisi del legame ammidico dell'anello  $\beta$ -lattamico, rendendo inattivo l'antibiotico nei confronti del suo bersaglio cellulare rappresentato dalle “*penicillin binding*

*proteins*” (PBP): le transpeptidasi che catalizzano la formazione dei legami crociati durante la sintesi del peptidoglicano. La nomenclatura delle diverse  $\beta$ -lattamasi si basava inizialmente sul numero e tipo di substrati (antibiotici) idrolizzati e sulla loro sensibilità a diversi inibitori. Secondo lo schema di classificazione di Ambler, invece, introdotto successivamente, le  $\beta$ -lattamasi, classificate sulla base della loro sequenza aminoacidica, vengono suddivise in quattro *classi*: A, B, C, e D. Un ulteriore e più recente sistema di classificazione che tiene conto sia di aspetti biochimici che molecolari, è quello che divide le  $\beta$ -lattamasi in 17 *gruppi funzionali*. Infine, possiamo suddividere questi enzimi in due grandi gruppi, prendendo in considerazione le caratteristiche del sito attivo (cioè la parte funzionale che idrolizza l’anello  $\beta$ -lattamico): le metallo- $\beta$ -lattamasi, con almeno uno ione  $Zn^{2+}$  nel sito attivo, e le serina- $\beta$ -lattamasi che nel sito attivo contengono invece un residuo di serina. Le prime sono tutte comprese nella classe B di Ambler, le seconde comprendono  $\beta$ -lattamasi di classe A, C e D (Bush, 2018) (Figura 1.2).





**FIG 1** Molecular and functional relationships among β-lactamases (adapted from references 20 and 201 with permission). AV, avibactam; CA, clavulanic acid; Cb, carbapenem; Cp, cephalosporin; E, expanded-spectrum cephalosporin; M, monobactam; P, penicillin.

**Figura 1.2** Classificazione delle β-lattamasi (Bush, 2018).

Le β-lattamasi a spettro esteso (ESβL) hanno sito attivo a serina, e sono caratterizzate dalla capacità di idrolizzare le penicilline e cefalosporine di terza generazione e l'aztreonam, mentre hanno attività nulla o scarsa nei confronti dei carbapenemi e sono inibite dai comuni inibitori delle β-lattamasi (acido clavulanico, sulbactam e tazobactam). La diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESβL è aumentata notevolmente in tutto il mondo, e ciò è attualmente considerata come una delle più rilevanti minacce per la salute pubblica (Pana & Zaoutis, 2018).

TEM, SHV e CTX-M sono i 3 principali tipi di ES $\beta$ L, appartenenti alla classe A delle  $\beta$ -lattamasi. In particolare il tipo CTX-M, che è diventata prevalente rispetto ai tipi SHV e TEM, rappresenta una famiglia di enzimi in espansione che si è diffusa in un'ampia gamma di batteri clinicamente importanti e molto diffusa anche dal punto di vista geografico. I geni per le ES $\beta$ L, presenti soprattutto nelle *Enterobacteriaceae* e in particolare nelle specie *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, sono stati trovati sia su trasposoni che plasmidi, ed ormai descritti in ceppi isolati in tutto il mondo (Pishtiwan & Khadija, 2019).

Le carbapenemasi rappresentano la famiglia più versatile tra le  $\beta$ -lattamasi, con un'ampiezza di spettro che non ha eguali se confrontate con altri enzimi idrolizzanti i  $\beta$ -lattamici. Esistono sia carbapenemasi che hanno un sito attivo a serina e possono essere inibite da acido clavulanico ed avibactam (un inibitore che non appartiene alla classe degli antibiotici  $\beta$ -lattamici) sia metallo-carbapenemasi che al contrario delle serina- $\beta$ -lattamasi, possono essere inibite dall'EDTA, un agente chelante dei metalli (Queenan & Bush, 2007). L'EDTA legandosi allo ione zinco del sito attivo della molecola, neutralizza la sua attività enzimatica.

Le carbapenemasi ad oggi conosciute, e di particolare importanza in ambito comunitario, appartengono alle classi A, B e D dei  $\beta$ -lattamici.

✓ Carbapenemasi appartenenti alla classe A

Tra le serina-carbapenemasi di classe A, troviamo 5 famiglie: NMC, IMI, SME (più rare), KPC e GES. Il loro meccanismo d'idrolisi dell'anello  $\beta$ -lattamico richiede una Serina in posizione 70, considerando il sistema di numerazione Ambler delle  $\beta$ -lattamasi. Hanno tutte la capacità di idrolizzare un'ampia varietà di  $\beta$ -lattamici, inclusi carbapenemi, cefalosporine, penicilline ed aztreonam (monobattamico); sono tutte inibite da acido clavulanico e tazobactam, e sono racchiuse nel gruppo funzionale 2f delle  $\beta$ -lattamasi. Gli acronimi NMC ed IMI stanno ad indicare rispettivamente “*not metalloenzyme carbapenemase*” e “*imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase*”; questi enzimi sono strettamente correlati tra loro dal punto di vista evolutivo ed hanno inoltre un'identità di sequenza del 70% con gli enzimi SME (*Serratia marcescens enzyme*) riscontrati per la prima volta in Inghilterra nel 1982 in due isolati di *S. marcescens*. I geni per queste tre carbapenemasi (NMC, IMI e SME) sono prevalentemente a localizzazione cromosomica, più raramente associati ad elementi genetici mobili, mentre KPC e GES nella maggior parte dei casi sono a codificazione plasmidica (Queenan & Bush, 2007).

L'enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) è certamente l'enzima più diffuso tra le *Enterobacteriaceae*, ed oltre a *K. pneumoniae*, la

sua presenza è stata riscontrata anche in altri membri della famiglia, come *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.* ed *Escherichia coli*; ma anche in *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* Fu trovato per la prima volta in un ceppo di *K. pneumoniae* isolato in North Carolina nel 1996, e già nel 1997 era diffuso in isolati clinici in alcuni ospedali di New York, e da allora continuò a diffondersi in tutto il mondo in maniera assai rapida. Del gruppo funzionale 2f delle carbapenemasi, la famiglia KPC ha il maggior potenziale di diffusione poiché a codificazione plasmidica (gene *bla<sub>KPC</sub>*) e quindi trasferibile, soprattutto perché si trova più frequentemente in ceppi di *K. pneumoniae*, una specie nota per la sua capacità di accumulare e trasferire determinanti di resistenza (Queenan & Bush, 2007). Anche la capacità di *E. coli* di disseminare i geni per la carbapenemasi KPC risulta allarmante, data l'ampia distribuzione a livello comunitario del microorganismo come commensale umano e animale (Doi & Peterson, 2015). In aggiunta, un'alta percentuale di isolati KPC positivi, presenta co-resistenza ai fluorochinoloni, cefalosporine e aminoglicosidi di terza generazione (ECDC, 2018).

✓ Carbapenemasi appartenenti alla classe B

Sono metallo-  $\beta$ -lattamasi (M $\beta$ L), che necessitano di ioni zinco per una efficiente attività idrolitica nei confronti dei  $\beta$ -lattamici, e quindi sensibili ad agenti chelanti quali l'EDTA. Hanno la capacità di idrolizzare tutti i carbapenemi, ed in buona parte anche penicilline e cefalosporine, mentre sono inattivi verso l'aztreonam. Le prime metallo- $\beta$ -lattamasi rilevate e studiate sono state enzimi a localizzazione cromosomica presenti in ceppi ambientali e patogeni opportunisti come *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., e *Stenotrophomonas maltophilia* (Queenan & Bush, 2007).

Tra questi enzimi, degne di nota sono certamente le carbapenemasi indicate dagli acronimi VIM, IMP e NDM, che stanno rispettivamente per “*Verona integron–encoded metallo- $\beta$ -lactamases*”, “*Imipenemase metallo  $\beta$ -lactamases*”, e “*New-Delhi metallo- $\beta$ -lactamases*”, e sono codificate dai geni *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>. Tali geni sono spesso localizzati su elementi genetici mobili (integroni di classe 1 e trasposoni) che sicuramente contribuiscono alla loro diffusione globale (Fisher et al., 2016). Il gene *bla*<sub>VIM</sub> è stato studiato per la prima volta a Verona nel 1997 da un isolato clinico di *P. aeruginosa*, come pure la prima forma di resistenza trasferibile all'imipenem fu descritta in *P. aeruginosa* in Giappone nel 1990; inoltre il primo enzima IMP ritrovato in Europa (IMP-2) fu anch'esso riportato in Italia, da un isolato di *Acinetobacter*

*baumannii*. Attualmente si conoscono numerose varianti alleliche degli enzimi di tipo IMP che sono ormai globalmente diffuse. La carbapenemasi di tipo NDM fu invece identificata per la prima volta nel 2008 da un paziente Indiano di New Delhi ricoverato in Svezia, da un isolato di *K. pneumoniae*; i microrganismi produttori di NDM sono stati ritrovati a New Delhi anche in specie patogene ad acquisizione comunitaria come *Salmonella enterica* e *Vibrio cholerae*; anche in questo caso i microrganismi che lo producono sono presenti in tutto il mondo, ed hanno mostrato una diffusione ben più rapida rispetto a quelli produttori di KPC sin dall'inizio (Doi & Peterson, 2015).

Di particolare interesse sono le M $\beta$ L di tipo CphA descritte negli anni '90 in ceppi di *Aeromonas* spp. Queste  $\beta$ -lattamasi sono specie-specifiche, prevalentemente trovate in *A. hydrophila* e *A. veronii* e hanno anche un profilo di substrati idrolizzabili molto ristretto. Sono infatti attivi solo su penemi e carbapenemi e non su penicilline e cefalosporine. Sono a localizzazione cromosomica, sono inducibili e recentemente sono state trovate due varianti CphA4 e CphA5 in isolati di *A. hydrophila* e *A. veronii* ambientali con uno spettro d'azione diverso rispetto a quello del prototipo CphA (Bottoni et al., 2015). La resistenza ai  $\beta$ -lattamici in queste due specie di *Aeromonas* dipende dalla co-produzione di più classi di  $\beta$ -lattamasi e in

particolare in *A. hydrophila* è frequente il fenotipo classe B, C e D mentre in *A. veronii* il fenotipo classe B e D (Wu et al., 2012).

Infine nell'ambito delle M $\beta$ L, continuano ad emergere nuovi tipi (es. GIM, SIM, AIM, ecc.) associate a batteri MDR Gram-negativi che destano molta preoccupazione per la scelta del trattamento terapeutico (El Salabi et al., 2013).

✓ Carbapenemasi appartenenti alla classe D

Le  $\beta$ -lattamasi di classe D, note anche come oxacillinasi o  $\beta$ -lattamasi-OXA (OXA), sono enzimi con sito attivo a serina come quelli di classe A e C. Hanno la capacità di idrolizzare oxacillina e cloxacillina (penicilline sintetiche), ma comprendono anche delle ES $\beta$ L e delle carbapenemasi. Queste ultime vengono definite CHDL, ovvero “*carbapenemase-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases*”, e molte di loro posseggono quindi un ampio spettro di attività (Poirel et al., 2010). Si conoscono circa 150 enzimi OXA, la maggior parte dei quali scoperti in ceppi patogeni di *A. baumannii*, ma anche varianti come OXA-48 (gene *bla*<sub>OXA-48</sub>) che viene prevalentemente riscontrato nelle *Enterobacteriaceae*, e venne identificato per la prima volta in un isolato di *K. pneumoniae* in Turchia nel 2001. Ulteriori indagini su questo isolato, evidenziarono che esso co-esprimeva diverse  $\beta$ -lattamasi, incluse le ES $\beta$ L di

classe A SHV-2a, e le  $\beta$ -lattamasi a spettro ristretto TEM-1 e OXA-47; inoltre, il gene *bla*<sub>OXA-48</sub> risultò essere a codificazione plasmidica e inserito in un trasposone composito (Tn1999). OXA-48 possiede un'attività catalitica molto alta verso le penicilline, ma non altrettanto elevata verso i carbapenemi, ad eccezione dell'imipenem verso il quale possiede la massima efficienza catalitica nota; mostra però un'attività molto debole verso le cefalosporine. La reale diffusione di OXA-48 rimane difficile da determinare, a causa della difficoltà nel rilevare gli isolati produttori dell'enzima in quanto possono presentare livelli variabili di resistenza ai carbapenemi e rimanere sensibili alle cefalosporine (Queenan & Bush, 2007; Poirel et al., 2012).

Nella tabella seguente (Tabella 1.2) sono riassunte le principali carbapenemasi prodotte e gli organismi dalle quali vengono solitamente isolate.

Type	Molecular class (subclass) <sup>a</sup>	Functional group <sup>b</sup>	Variants	Species
KPC	A	2f	KPC-2 to -13	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Raultella</i> spp.
VIM	B (B1)	3a	VIM-1, -2, -4, -5, -6 VIM-11, -12, -13, -19, -23 VIM-24, -25, -26, -27, -32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus stuartii</i> , <i>P. mirabilis</i>
IMP	B (B1)	3a	IMP-1, -3, -4, -6, -8 IMP-11, -24, -27	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>M. morganii</i>
NDM	B (B1)	3a	NDM-1, -4, -5, -6	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i> , <i>Providencia</i> spp.
OXA	D	2df	OXA-48, -163, -181	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i>

**Tabella 1.2** Tipi, classificazione e varianti di carbapenemasi riscontrate nelle *Enterobacteriaceae* (Tzouvelekis et al., 2012).



#### ***1.4 Diffusione delle Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi***

La resistenza ai farmaci carbapenemi da parte dei batteri Gram-negativi, è aumentata a dismisura da 10 anni a questa parte ed è in continuo aumento, rappresentando un serio problema di salute pubblica; i microrganismi in questione tra l'altro, sono spesso resistenti anche ad altre classi di antibiotici risultando MDR, a causa della co-acquisizione di determinanti di resistenza posizionati sugli stessi elementi genetici mobili (Fisher et al., 2017).

Inizialmente, l'antibiotico-resistenza dovuta alla produzione di carbapenemasi fu descritta principalmente in *P. aeruginosa* ed *A. baumannii* in Grecia e nel Sud-Est Asiatico come fenomeno sporadico, mentre ad oggi è ampiamente diffusa anche in specie quali *E. coli* e *K. pneumoniae*, che fanno parte del cosiddetto microbiota intestinale dell'uomo, ma che possono essere responsabili di infezioni nosocomiali soprattutto all'apparato urinario (*E. coli* anche in ambito comunitario) e respiratorio (soprattutto *Klebsiella*). L'ospedalizzazione è, di fatto, uno dei fattori di rischio per le infezioni da *Enterobacteriaceae* produttrici di Carbapenemasi (CPE, Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*), o resistenti ai carbapenemi (CRE, Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*). Tali infezioni sono frequenti soprattutto nei pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva (la ventilazione assistita favorisce l'insorgenza di affezioni alle vie respiratorie,

poiché i microrganismi possono by-passare i meccanismi di difesa delle prime vie aeree), o nei portatori di cateteri urinari o venosi centrali. In quest'ultimo caso non è rara l'insorgenza di gravi complicanze quali la sepsi catetere-correlata (Tangdén & Giske, 2014).

Secondo quanto segnalato all'Istituto Superiore di Sanità, in Italia nel 2018 sono stati segnalati più di 2200 casi di batteriemia da CPE, ed il Centro Italia è risultata l'area geografica con maggiore incidenza di casi. La quasi totalità delle batteriemie da CPE diagnosticate nel 2018 è stata causata da *K. pneumoniae* (97.7%), e solo una piccola parte da *E. coli* (2.3%); la maggior parte dei casi segnalati (86.1%) riguardava pazienti di nazionalità italiana, e che al momento dell'inizio della sintomatologia già si trovavano all'interno della struttura ospedaliera, mentre l'11.7% si trovava a domicilio e solo il 2.1% in una struttura residenziale territoriale. L'origine presunta della batteriemia è stata attribuita principalmente alla presenza di un catetere venoso centrale/periferico nel 24.6% dei casi, ad una infezione delle vie urinarie nel 21.6% e ad un'infezione primaria nel 21.9% (<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/cpe-dati>).

La carbapenemasi prodotta più frequentemente dai ceppi responsabili era KPC, seguita da NDM e VIM (Figura 1.3).

Carbapenemasi	<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>		Totale	
	n	%	n	%	n	%
KPC	1300	94,3	12	40,0	1312	93,1
MBL*	37	2,7	11	36,7	48	3,4
KPC+MBL**	6	0,4	0	0,0	6	0,4
OXA-48	26	1,9	5	16,7	31	2,2
MBL*** + OXA-48	2	0,1	0	0,0	2	0,1
KPC + OXA-48	1	0,1	0	0,0	1	0,1
N.D.	7	0,5	2	6,7	9	0,6
non indicato	778		20		798	
<b>Totale</b>	<b>2157</b>		<b>50</b>		<b>2207</b>	

KPC: *K. pneumoniae* carbapenemasi; MBL: metallo-beta-lattamasi; OXA-48: oxacillina-48 con attività carbapenemasi

VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lattamasi; NDM: New Delhi metallo-beta-lattamasi

\* Genotipo disponibile per 34 MBL: 15 VIM (12 in *K. pneumoniae*; 3 in *E. coli*) e 19 NDM (14 in *K. pneumoniae*; 5 in *E. coli*)

\*\* Genotipo disponibile per 4 MBL: 4 VIM (solo in *K. pneumoniae*)

\*\*\* Genotipo disponibile per 2 MBL: 2 NDM (solo in *K. pneumoniae*)

§ N.D.: Non interpretabile (discrepanza tra risultato genotipico e fenotipico)

### Figura 1.3 Geni e ceppi maggiormente responsabili di batteriemie in Italia

(<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/cpe-dati>).

Le prime epidemie da CPE avvennero in Grecia e negli USA a partire dal 2000, prettamente in ambito nosocomiale: in Grecia i ceppi implicati erano essenzialmente VIM-produttori, mentre negli USA prevalevano i KPC. Dopo alcuni anni, in Grecia i ceppi VIM-positivi sono stati sostituiti da quelli KPC-positivi, che si sono diffusi poi in Israele, Italia ed Asia. Entrambi gli enzimi erano comunque ancora “confinati” alla specie *K. pneumoniae*; mentre quando pochi anni più tardi si diffusero sempre più ceppi NDM-positivi, tale carbapenemasi fu riscontrata in un ben più ampio numero di specie, comprese quelle responsabili di infezioni in ambito comunitario come *E. coli*. Attualmente, tuttavia, sebbene la produzione di KPC rimane prevalentemente

associata a ceppi di *K. pneumoniae*, il gene che la codifica può essere acquisito da altre *Enterobacteriaceae*, quali *Enterobacter* spp. ed *E. coli*, e, anche se con minor frequenza anche da *Pseudomonas* spp. ed *Acinetobacter* spp (Tangdén & Giske, 2014).

Ci sono differenze significative nella distribuzione attuale delle carbapenemasi nel mondo: in Europa prevale il tipo KPC, seguito da NDM, VIM ed OXA-48, mentre gli enzimi IMP prevalgono in Australia e nell'Estremo Oriente (Bonardi & Pitino, 2019).

Un fenomeno sempre più preoccupante, riguarda il ritrovamento di CPE in animali da allevamento, come suini, bovini e volatili. A causa dell'utilizzo di antibiotici nell'allevamento, è possibile che residui di antimicrobici presenti nel letame e utilizzato come ammendante, possano essere rilasciati nel suolo. In questo modo, sia gli antibiotici che i batteri resistenti possono raggiungere le acque superficiali, e contribuire alla contaminazione di terreni, colture e animali selvatici; inoltre attraverso le acque di scarico contaminate, batteri resistenti e geni di resistenza possono raggiungere un'ampia diffusione, con conseguenze dannose per l'intero ecosistema (Bonardi & Pitino, 2019).

Il primo rilevamento di CPE nei suini risale al 2011, quando un ceppo di *E. coli* (ST88) produttore di VIM-1 è stato isolato da una grossa azienda agricola tedesca che allevava 4.100 maiali, dove il ceppo risultava ampiamente

prevalente nell'ambito della fattoria. I campioni esaminati erano soprattutto campioni fecali (Fisher et al., 2016) e l'indagine molecolare dimostrò che il gene *bla*<sub>VIM-1</sub> era localizzato in un integrone denominato In110, già ritrovato in precedenza in altri Enterobatteri quali *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae*, così come in organismi non-fermentanti quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* in Italia e Spagna. Questo indica che la trasmissione di elementi genetici mobili può avvenire anche tra patogeni e commensali grazie al trasferimento genetico orizzontale, causando la diffusione delle resistenze anche tra specie diverse (Bonardi & Pitino, 2019). Ulteriori studi condotti in altre fattorie nel mondo fino al 2014 (Cina, Francia, USA, New Mexico ed Egitto) hanno rilevato la prevalenza di geni *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA</sub>, provenienti da campioni fecali di bovini e pollame in ceppi di *Acinetobacter* spp., ma anche di *E. coli* e *K. pneumoniae* (Bonardi & Pitino, 2019). In Egitto sono state ritrovate, in campioni provenienti da carne di pollo venduta al dettaglio, *Enterobacteriaceae* produttrici di ESβL, ed almeno un isolato su 10 risultava resistente anche ai carbapenemi (11,32% degli isolati), evidenziando come questo sia un importante problema di salute pubblica, poiché il trasferimento all'uomo di batteri resistenti tramite la catena alimentare risulta più che semplice (Abdallah et al., 2015). Nel 2015 e nel 2016 è stata riportata la presenza di *Klebsiella variicola* produttrice di *bla*<sub>OXA</sub>.

<sup>181</sup> in ortaggi freschi importati in Svizzera dall'Asia. I risultati di questo studio suggeriscono che anche la produzione ed il commercio internazionale di ortaggi freschi costituiscono una possibile via per la diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (Zurfluh et al., 2015, 2016). Inoltre, nel 2018, Milanović e collaboratori hanno pubblicato uno studio di ecologia microbica per la ricerca diretta di geni codificanti carbapenemasi in campioni di insetti edibili, e i risultati dello studio indicano la necessità di una maggiore attenzione dal punto di vista della sicurezza alimentare, che va estesa a varie tipologie di alimenti. Sono stati infatti analizzati 30 campioni d'insetti appartenenti alla specie *Locusta migratoria migratoroides* e 30 campioni di larve di *Tenebrio molitor* (un coleottero), riscontrando la presenza del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> in un campione di larve di *T. molitor* (3%) e nel 57% dei campioni di locuste. Il gene *bla*<sub>NDM-1</sub> era presente in 3 campioni (10%) di larve *T.molitor* e nel 27% dei campioni di locuste; mentre *bla*<sub>VIM</sub> è stato riscontrato nel 7% dei campioni di locuste (Milanović et al., 2018).

Di recente, un ceppo di *E. coli* (ST10) produttore di VIM-1 è stato isolato da vongole *Ruditapes philippinarum* raccolte nel Mar Mediterraneo italiano (Koch et al., 2018), suggerendo che i CPE potrebbero aver raggiunto anche l'ambiente marino. I frutti di mare vengono spesso consumati crudi oggiogiorno, condizione questa ideale per la trasmissione e diffusione di tali

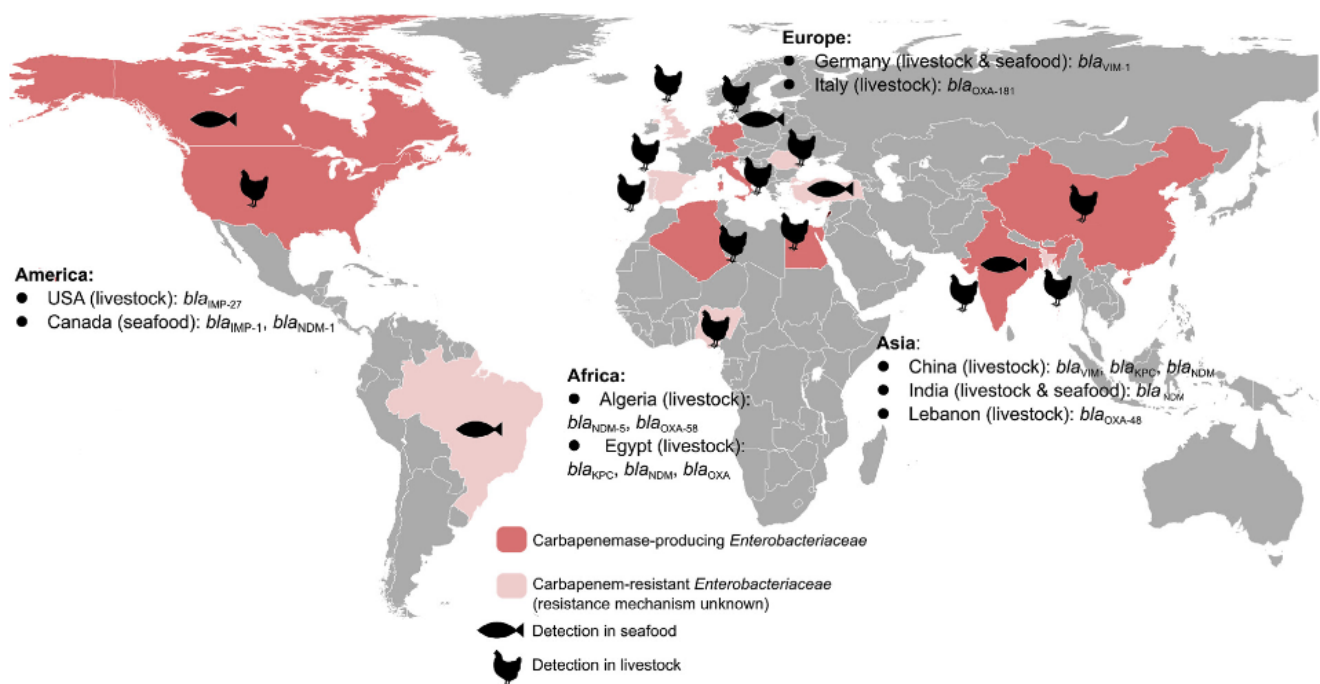
batteri ai consumatori e/o per il trasferimento dei rispettivi plasmidi contenenti i geni di resistenza (Bonardi & Pitino, 2019).

Come vediamo nelle immagini sottostanti (Tabella 1.3 e Figura 1.4), la presenza di CPE a livello ittico, che coinvolge molluschi, crostacei e pesci è diffusa in tutto il mondo; la Figura 1.4 mostra anche la diffusione mondiale della resistenza ai carbapenemi negli animali d'allevamento.

Country	Year(s) of sample collection	Samples	Type of study (target organism(s))	Carbapenem-resistant species (carbapenemase), if detected
Brazil	NA	Shrimps	Non-selective	<i>E. coli</i> (NA)
Canada	2011–2015	Shrimps, molluscs	Selective prevalence screening (CRE)	<i>E. cloacae</i> ( <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> ), <i>E. aerogenes</i> ( <i>bla</i> <sub>IMP-2</sub> ), <i>E. cloacae</i> ( <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> )
Canada	NA	Clams, squids, sea squirts, shrimps, octopuses, mussels	Selective prevalence screening (CRE)	No CRE; <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> in <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Myroides</i> , <i>Pseudomonas</i> .
India	2013–2014	Fish, shrimps, clams, and squids	Non-selective	<i>E. coli</i> ( <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ) and <i>Citrobacter</i> ( <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> )
Germany	2015–2016	Shrimps, blue mussels, venus clams, razor shells, cockles	Non-selective	<i>E. coli</i> ( <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> )

**Tabella 1.3** Diffusione di carbapenemasi e CPE nei frutti di mare destinati al consumo alimentare.

(Köch et al., 2018)

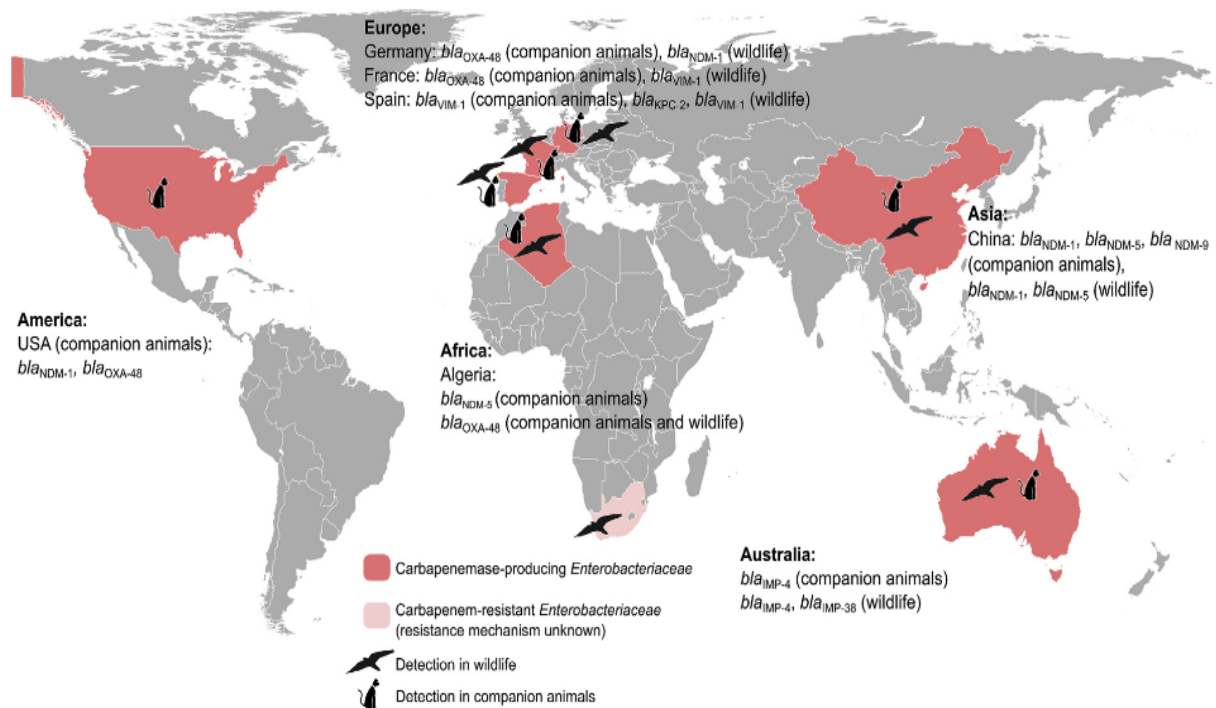


**Figura 1.4** Distribuzione globale di CPE e CRE nel bestiame e nei prodotti ittici (Köck et al., 2018).

Batteri resistenti ai carbapenemi e produttori di carbapenemasi sono stati riscontrati anche in animali da compagnia. Sebbene la somministrazione di carbapenemi in ambito veterinario non sia autorizzata per nessun animale (sia domestico che d'allevamento), nel Regno Unito in casi eccezionali, è possibile la somministrazione ad animali da compagnia quando questi presentino infezioni persistenti causate da batteri resistenti (Woodford et al., 2013). L'utilizzo è comunque generalmente limitato all'imipenem, in cani con infezioni al tratto urinario sottoposti ad interventi chirurgici, ma la British



Small Animal Veterinary Association avverte che l'utilizzo è in aumento e andrebbe bloccato in ambito veterinario (Woodford et al., 2013); questa precauzione sarebbe utile ad inibire l'aumento delle antibiotico-resistenze, per lo meno quello correlato con l'uso di farmaci. Una panoramica sulla diffusione globale della resistenza ai carbapenemi per quanto riguarda animali da compagnia ed animali selvatici, è rappresentata in Figura 1.5.



**Figura 1.5** Diffusione CPE e CRE nel mondo negli animali da compagnia ed animali selvatici (Köck et al., 2018).

E' chiaro quindi che i batteri produttori di carbapenemasi (CPB; Carbapenemase-producing bacteria) sono sempre più diffusi nell'ambiente, e diversi studi hanno dimostrato che una delle vie tramite le quali i geni per la resistenza entrano nell'ambiente sono le acque reflue, in particolar modo quelle degli ospedali: i loro scarichi si mescolano a quelli urbani, per essere convogliati verso impianti per il trattamento delle acque reflue e poi rilasciati nell'ambiente; in tali impianti i batteri possono sopravvivere, potendo diffondere a livello ambientale e quindi arrivare all'uomo o agli animali (Yang et al., 2016). In particolare, l'uso in agricoltura ed acquacoltura, di acqua fluviale potenzialmente contaminata da batteri resistenti, aumenta il rischio di diffusione dei microrganismi e dei geni di resistenza lungo le catene alimentari (Bonardi & Pitino, 2019).

Molti studi supportano l'ipotesi che le acque reflue possano fungere da reservoir o da nicchia per i CPB, migliorando il potenziale trasferimento di determinanti genetici tra diverse specie batteriche e facilitando la loro diffusione nei corsi d'acqua o nelle zone costiere (Scotta et al., 2011). Ad esempio, uno studio pubblicato nel 2014 rileva la presenza di CPB, quali *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. ed *Aeromonas* spp. nelle acque delle spiagge turistiche a Rio de Janeiro. Il gene maggiormente identificato è stato *bla*<sub>KPC-2</sub> (che differisce da *bla*<sub>KPC</sub> per una

sostituzione aminoacidica), seguito da *bla<sub>GES</sub>* (quest'ultimo codificante per una carbapenemasi non molto diffusa, il quale acronimo sta per “*Guyana extended-spectrum*”). Spesso è stata riscontrata anche la presenza di determinanti genetici per la resistenza ai chinoloni (geni *qnr*), antimicrobici sintetici ad azione battericida che inibiscono la sintesi del DNA, a dimostrazione del fatto che i batteri resistenti ai carbapenemi sviluppano multiresistenze; e che in questo caso le acque costiere fungono da reservoir per tali microrganismi MDR di particolare rilevanza clinica (Montezzi et al., 2014).

Da tutto ciò, si evince che l'antibiotico-resistenza è una reale emergenza sanitaria e che geni e batteri che conferiscono resistenza agli antibiotici, tra cui anche i carbapenemi, si trasferiscono tra ecosistemi diversi (acqua, suolo, animali, piante, cibo, uomo...) strettamente collegati fra loro (Caniça et al., 2015), pertanto è fondamentale attuare programmi di monitoraggio della diffusione di resistenze in sistemi agricoli e negli allevamenti, al fine di controllare e limitare il diffondersi di tali resistenze (Fisher et al., 2017; Webb et al., 2016).

La tabella che segue (Tabella 1.4) riassume i risultati ottenuti in alcuni studi dal 2003 al 2013, che rilevano la presenza di CPE in svariati campioni, provenienti dai vari reservoir esposti in questo paragrafo.

Enzyme	Species	Source	Country	Year
KPC (class A)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Cubana	human (faeces)	USA	2003
	multiple genera	hospital sewage, effluent	Brazil	2011, 2013
	<i>E. coli</i>	river	Portugal	2012
	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	hospital sewage	China	2012
IMI (class A)	<i>Enterobacter asburiae</i>	rivers	USA	2005
VIM (class B)	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	river, sewage	Portugal	2005, 2006
	PCR amplicons only	sewage, effluent	Germany	2009
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky	human (faeces)	Morocco	2010
	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis	pig and poultry farms, flies, mice, manure	Germany	2012, 2013
	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	river	Tunisia	2013
	<i>K. pneumoniae</i>	river	Switzerland	2013
IMP (class B)	PCR amplicons only	sewage, effluent	Germany	2009
	<i>K. pneumoniae</i>	river	Tunisia	2013
OXA-48 (class D)	PCR amplicons only	sewage, effluent	Germany	2009
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovars Kentucky and Saintpaul	human (faeces)	Egypt	2010
	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	dogs	Germany	2013
NDM (class B)	multiple genera	water	India	2011
	<i>K. pneumoniae</i>	river	Vietnam	2012
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	poultry	China	2012
	<i>A. baumannii</i>	pig	China	2013
	<i>E. coli</i>	dogs/cat	USA	2013
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg	human (perirectal screen)	USA/India	2012
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Westhampton	human (urine, faeces)	Reunion Island/India	2012
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Corvallis	black kite (wild raptor)	Germany	2013
	<i>A. baumannii</i>	water, hospital sewage	China	2013
	OXA-23 (class D)	<i>Acinetobacter</i> 15TU	dairy cows	France
<i>Acinetobacter</i> sp.		horses	Belgium	2012

**Tabella 1.4** Diffusione delle principali carbapenemasi nel mondo, nei vari reservoir (Woodford et al., 2013).

## SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di batteri Gram-negativi resistenti agli antibiotici carbapenemi per la produzione di enzimi carbapenemasi, in campioni di diversa origine: ambientale, animale ed alimentare. Lo scopo è stato infatti valutare la diffusione della resistenza ai carbapenemi attraverso il riconoscimento di eventuali reservoir in ambito non ospedaliero: questo rappresenterebbe un ulteriore rischio per la salute umana, poiché i geni che codificano le carbapenemasi potrebbero trasferirsi facilmente all'uomo, aumentando la già alta diffusione di tale resistenza. La ricerca di questi microrganismi si è basata sulla semina dei campioni su terreni selettivi contenenti basse concentrazioni di ertapenem per selezionare prevalentemente batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. I ceppi isolati sono stati poi caratterizzati per il tipo di carbapenemasi prodotta (grazie alla ricerca mediante PCR dei geni più frequentemente coinvolti nella resistenza, quali *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>) e analizzati per eventuali caratteristiche genotipiche e fenotipiche.

## 2. MATERIALI E METODI

### *2.1 Campionamento*

Il campionamento è consistito nell'analisi di un totale di 117 campioni isolati nel periodo Settembre 2018-Settembre 2019, così suddivisi:

- ✓ 62 ceppi ottenuti da campioni provenienti da diverse aziende zootecniche della Regione Marche. A partire da 11 diverse matrici è stato ottenuto il seguente numero di isolati: 17 da Feci Suine; 16 da Carne Suina; 5 da Feci Bovine; 4 da Carne Bovina; 5 da Rene Suino; 5 da Fegato Suino; 2 da Mangime Suino; 1 da Mangime Bovino; 1 da Salame di fegato; 2 da Salame; 1 da Lonza; 1 da Pancetta e 2 da Formaggio.

I prelievi di feci sono stati ottenuti da un mix di 3-5 campioni di feci, prelevate all'interno del box in cui erano allevati i soggetti che sono stati macellati, successivamente è stata prelevata la quantità necessaria per riempire un contenitore per feci sterile (60 mL).

Un campione di carne (100 g), un fegato ed un rene interi sono stati prelevati direttamente al mattatoio da 5 soggetti macellati in due differenti giorni di macellazione.

Il fieno (30 g) e gli sfarinati di cereali (100 g), utilizzati come mangimi, sono stati prelevati direttamente dai fienili e dai silos.

I campioni di formaggio (100 g) e salame (100 g) sono stati prelevati al banco vendita dell'azienda.

Il campionamento è stato sempre effettuato in condizioni di sterilità con guanti sterili monouso, forbici e pinze sterili, sacchetti per Stomacher e contenitori sterili per feci. Arrivate in laboratorio in condizioni refrigerate, le matrici sono state conservate in cella fredda (4°C) e processate entro 24 ore.

- ✓ 28 ceppi isolati da Molluschi Bivalvi appartenenti alla specie *Chamelea gallina*, forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "TOGO ROSATI" (Sezione di Ancona);

I molluschi sono stati raccolti da diversi banchi naturali lungo un tratto di circa 30 km della costa marchigiana (da Ancona a Gabicce). Un campione di vongole era un lotto di 40–80 vongole. Il numero di campioni raccolti da ciascuna delle aree variava da 6 a 14, in base al monitoraggio stagionale e al tempo di raccolta dei molluschi.

- ✓ 21 ceppi isolati da campioni di sedimento marino, zooplancton e di acqua, prelevati in corrispondenza di tre diversi siti della costa marchigiana e tre siti in prossimità del porto di Genova.

La raccolta dei campioni di zooplancton è stata eseguita trainando l'acqua dall'imbarcazione con un apposito retino (diametro: 50 cm, maglia: 0.2 mm), per 2 minuti e 30 secondi alla velocità costante di 3 nodi. Successivamente, il retino veniva sciacquato dall'esterno con acqua di mare ed il materiale accumulato all'interno del retino veniva raccolto in bottiglie sterili.

L'acqua di superficie veniva raccolta in quantità di 1 Litro con bottiglie in pyrex sterili. Infine, per il sedimento, venivano effettuate delle bennate (una per sito) raccogliendo il materiale da diversi punti della bennata in falcon da 50 ml. Il cucchiaino con cui è stato prelevato il sedimento è stato sterilizzato alla fiamma prima di ogni bennata. I campioni prelevati venivano mantenuti in una borsa termica con ghiaccio fino al momento dell'analisi.



## 2.2 Terreni di Coltura

### ✓ *MacConkey Agar*

Il terreno di coltura principalmente utilizzato per l'isolamento delle *Enterobacteriaceae* è stato il MacConkey Agar (VWR Chemicals®). Esso è infatti un terreno selettivo per i Gram Negativi grazie alla presenza di Sali Biliari e Cristalvioletto che inibiscono la crescita dei Gram Positivi e di alcuni batteri Gram Negativi esigenti. Inoltre, è anche un terreno differenziale grazie alla presenza del Lattosio come unica fonte di carboidrati che permette la distinzione tra batteri fermentanti e non-fermentanti. I batteri lattosio-fermentanti, come *E. coli* e *Klebsiella*, producono colonie con varie sfumature di rosa, dovute al viraggio dell'indicatore rosso neutro per la produzione di acidi misti (Figura 2.1). Nel nostro studio è stato utilizzato per l'isolamento delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi mediante l'aggiunta di ertapenem a concentrazione di 0.5 µg/ml.



**Figura 2.1.** Crescita di batteri lattosio-negativi e lattosio-positivi su MacConkey Agar (<http://microbeonline.com/>).

COMPOSIZIONE DEL MACCONKEY AGAR TIPICA PER LITRO, DOPO  
SCIOGLIMENTO IN ACQUA DEIONIZZATA:

Peptoni	20 g
Lattosio Monoidrato	10 g
Sali Biliari	1.5 g
NaCl	5 g
RossoNeutro (indicatore)	0.030 g
Cristalvioletto	0.001 g/L
Agar	13.5 g/L

pH finale  $7.1 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

✓ *Mueller Hinton Agar (MH)*

Il Mueller Hinton Agar (MHA) è un terreno utilizzato prettamente per i test di sensibilità agli antibiotici per diffusione. In questa tesi MHA (Oxoid®) è stato utilizzato per il Modified Hodge Test.

COMPOSIZIONE TIPICA PER LITRO DEL MUELLER HINTON AGAR, DOPO  
SCIOGLIMENTO IN ACQUA DEIONIZZATA:

Estratto di Carne	2.0 g
Idrolisato acido di Caseina	17.5 g
Amido solubile	1.5 g
Agar	17 g

pH finale  $7.3 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$

✓ *Mueller Hinton Broth II* (MHII)

Il brodo Mueller Hinton II (Fluka Analytical®) è stato utilizzato prevalentemente per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC).

COMPOSIZIONE TIPICA PER LITRO DEL MUELLER HINTON BROTH, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA DEIONIZZATA:

Estratto di carne bovina	3.0 g
Idrolisato acido di Caseina	17.5 g
Amido solubile	1.5 g

pH finale  $7.3 \pm 0.2$  a 25°C

✓ *Brain heart infusion broth* (BHI)

Il BHI è un terreno d'uso generale, utilizzato per la coltivazione di una larga varietà di batteri e funghi, esigenti e non, aerobi ed anaerobi. L'infuso di cuore e cervello e la miscela di peptoni sono fonti di azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita microbica; il glucosio costituisce una fonte di energia, il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico, il sodio fosfato bibasico è incluso come sistema tampone del pH del terreno (<http://biolifeit.com>). In questa tesi il BHI (Liofilchem®) è stato utilizzato per

l'inoculazione di ceppi batterici prevalentemente nelle fasi che precedono la PFGE ed il Test di Hodge.

COMPOSIZIONE TIPICA PER LITRO DEL BRAIN HEART INFUSION AGAR, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA DEIONIZZATA:

Infuso di cuore e cervello	17.5 g
Peptocomplex	10.0 g
Glucosio	2.0 g
Sodio cloruro	5.0 g
Sodio fosfato bibasico	2.5 g

pH 20-25°C  $7,4 \pm 0,2$ .

Seguiva sterilizzazione in autoclave.

✓ *m-FC Agar*

Terreno selettivo e differenziale per la conta dei coliformi fecali nelle acque col metodo della filtrazione su membrana (Oxoid®).

Triptosio	10 g
Peptone proteose	5 g
Estratto di lievito	3 g
Sodio cloruro	5 g
Lattosio	12.5 g
Sali biliari	1.5 g
Blu di anilina	0.01 g
Agar	10 g

pH finale a 25°C =  $7.4 \pm 0.2$

Dopo aver raggiunto l'ebollizione per 1 minuto, venivano aggiunti 0.05 g di Acido Rosolico (Difco™, BD) in 1ml di NaOH 1M + 4ml di H<sub>2</sub>O, e si faceva bollire per un ulteriore minuto. Non necessitava sterilizzazione in autoclave.

✓ *Luria Bertani broth (LB)*

Terreno standard ad alta concentrazione salina, ideale per la crescita di *E. coli* ed altre *Enterobacteriaceae*, utilizzato per l'arricchimento dei microrganismi dagli omogenati.

Per 1 litro di acqua venivano addizionati: 10g di Triptone (Liofolchem®); 5 g di Estratto di lievito (Liofilchem®), e 10 g di NaCl. Seguiva sterilizzazione in autoclave.

pH finale a 25°C:  $7.0 \pm 0.2$

### ***2.3 Processamento dei campioni***

I vari campioni (sedimento, molluschi, feci, carne ed altre matrici alimentari) subivano un processamento necessario per la successiva estrazione del DNA.

#### ✓ CAMPIONI DI FECI, CARNE ED ALTRE MATRICI ALIMENTARI

I campioni di carne, feci ed altre matrici alimentari venivano omogenizzati previa sospensione in acqua peptonata tamponata, in concentrazione 1:10 (25 g di carne in 250 ml di acqua peptonata tamponata, e 10 g di feci in 100 ml di acqua peptonata tamponata). Si allestivano quindi diluizioni dell'omogenato che venivano, in seguito, seminate su terreno selettivo per la conta dei coliformi (MacConkey), e poi incubate a 37°C overnight. Contemporaneamente, aliquote da 1,5 ml di omogenato venivano centrifugate ed i pellet congelati per la successiva estrazione di DNA. L'omogenato veniva diluito 1:100 in brodo LB + ertapenem 0,12 µg/ml (ovvero 100 µl aggiunti a 10 ml di brodo LB + 0.12 µl di ertapenem), ed incubato overnight a 37°C. Il giorno successivo, dai campioni in cui si osservava crescita microbica si procedeva ad isolamento su MacConkey addizionato ad ertapenem 0,25 µg/ml; seguiva ulteriore incubazione a 37°C overnight.

#### ✓ CAMPIONI DI MOLLUSCHI

I molluschi venivano omogenizzati previa aggiunta di 50g di campione in 500 ml di Acqua Peptonata Tamponata. Si inoculavano poi 10 ml, 1 ml e 0,1ml di omogenato in terreno MMGM per coliformi (procedura standard per la conta

dei coliformi mediante MPN – Most Probable Number), e si incubava a 37°C overnight. Contemporaneamente, aliquote da 1,5 ml di omogenato venivano centrifugate ed i pellet congelati per la successiva estrazione di DNA.

Dal brodo MMGM si effettuava una diluizione 1:100 in brodo LB + 0,12 µg/ml ertapenem (100 µl aggiunti a 10 ml di brodo LB + 0.12 µl di ertapenem), e si incubava overnight a 37°C. Il giorno successivo, dai campioni in cui si osservava crescita microbica si procedeva ad isolamento su MacConkey addizionato ad ertapenem 0,12 µg/ml; seguiva ulteriore incubazione a 37°C overnight.

#### ✓ CAMPIONI DI SEDIMENTO MARINO

Ogni campione, raccolto in falcon da 50 ml, veniva diluito 1:10 in soluzione fisiologica sterile (30 g di sedimento per 300 ml). Si sonicava in bagnetto 3 volte per un minuto, intervallando ogni sonicazione a 30 secondi di vortex; seguiva la decantazione per la separazione del sovrantante dal sedimento. Si procedeva quindi con la filtrazione di 10 ml di sovrantante tal quale e di 10 ml di sovrantante diluito 1:10, utilizzando membrane da 0.22 µm, posizionate successivamente su terreno mFC. Si incubavano quindi le piastre in termostato a 37°C, overnight, per la successiva identificazione dei coliformi. Il sovrantante sonicato veniva, inoltre, inoculato in concentrazione

1:100 in brodo LB addizionato ad ertapenem 0.12 µg/ml. Seguiva incubazione a 37°C overnight. Dal brodo di arricchimento LB + ertapenem si allestivano diluizioni seriali per poi piastrarne 100 µl su MacConkey addizionato ad ertapenem 0.25 µg/ml.

#### ✓ CAMPIONI DI ZOOPLANCTON ED ACQUA DI SUPERFICIE

Per ogni sito di raccolta dello zooplancton, 40 ml del materiale raccolto venivano centrifugati a 15000 x g per 10 minuti, ed il pellet risospeso in 15 ml di acqua di mare artificiale sterile (salinità del 35%). Il pellet risospeso (5 ml) veniva messo in arricchimento con 40 ml di acqua peptonata tamponata.

Per i campioni di acqua di superficie sono state effettuate 3 filtrazioni da circa 400 ml di acqua con filtri da 0.22 µm, ed i filtri sono stati risospesi in 25 ml di acqua peptonata tamponata. Gli arricchimenti venivano poi incubati a 37°C overnight.

#### ***2.4 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)***

Il metodo utilizzato per valutare la sensibilità dei ceppi è la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico necessaria ad inibire la crescita di un



microorganismo. Questa metodica è stata eseguita secondo le procedure standard del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

L'antibiotico, in questo caso l'ertapenem, veniva utilizzato per allestire delle diluizioni scalari, in brodo Muller Hinton II (MH II, Sigma-Aldrich) direttamente in piastre microtiter. Il range di concentrazione saggiato andava da 0,006 µg/ml a 8 µg/ml.

L'antibiotico veniva preparato a una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata da saggiare: quindi 50µl di brodo MH II contenente 16 µg/ml di ertapenem venivano inoculati nella prima e nella seconda colonna della piastra. Partendo dalla seconda colonna, per allestire delle diluizioni scalari (1:2) dell'antibiotico, si prelevavano con una pipetta multicanale 50 µl e si inoculavano nella colonna successiva; si procedeva in questo modo fino alla penultima colonna. In ogni riga veniva inoculato un ceppo diverso (compreso il ceppo di controllo *E. coli* ATCC® 25922), le cui brodocolture erano state precedentemente standardizzate in modo da contenere  $1 \times 10^8$  Unità Formanti Colonia (UFC)/ml. La sospensione veniva ulteriormente diluita 1:100 ottenendo una concentrazione finale pari a  $5 \times 10^5$  CFU/ml. La piastra veniva infine incubata in termostato a 37°C overnight.

Il giorno successivo si procedeva con la lettura dei risultati, facendo riferimento ai valori riportati nelle tabelle fornite dal CLSI e dopo aver verificato che il ceppo di controllo ATCC 25922 rientrasse nei limiti previsti. Per l'ertapenem, il breakpoint di resistenza per le *Enterobacteriaceae*, è di 1 µg/ml, pertanto tutti i ceppi che mostravano un valore di MIC  $\geq 1$  erano resistenti.



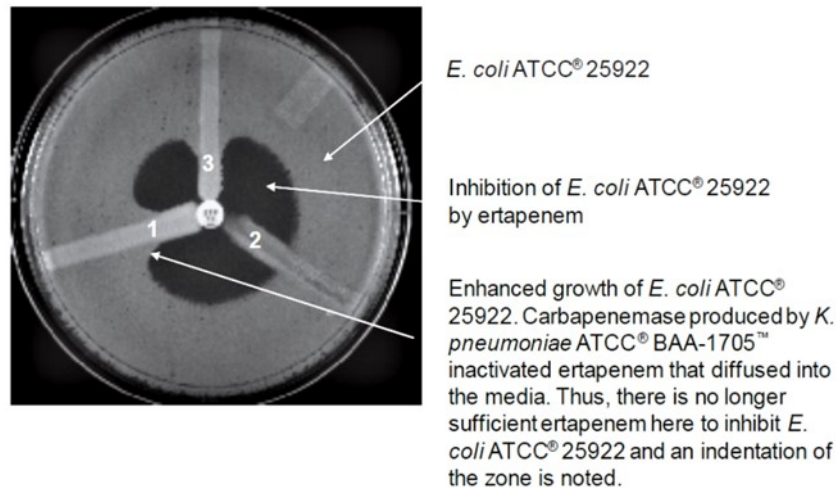
**Figura 2.2** Piastra microtiter utilizzata per le MIC  
(<http://biosigma.it>).

## ***2.5 Test di Hodge Modificato***

Il test di Hodge Modificato è un saggio utile a determinare la produzione di carbapenemasi nei diversi ceppi isolati.

Brevemente, il ceppo di riferimento *E. coli* ATCC 25922, precedentemente standardizzato, veniva seminato, con tampone sterile, su una piastra di MH agar. Successivamente veniva posizionato un dischetto di ertapenem, alla concentrazione di 10 µg, al centro della piastra (Figura 2.3). Due ceppi da testare venivano poi prelevati con ansa da batteriologia ed usati per inoculare due dei tre raggi della piastra, attraverso semina radiale. Il terzo raggio è stato strisciato con un ceppo produttore di carbapenemasi, come controllo (ad esempio *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705TM, come visibile in Figura 2.3). Si procedeva con l'incubazione a 37°C overnight. Il giorno seguente veniva osservato il risultato del test analizzando la zona di intersezione tra l'isolato da testare ed il ceppo *E. coli* ATCC 25922.

Il test rileva la presenza di carbapenemasi se l'alone di inibizione del ceppo di controllo si deforma attorno allo striscio dell'isolato da testare (infatti la produzione di carbapenemasi permette al ceppo di *E. coli* ATCC 25922 di crescere, senza essere inibito dall'ertapenem diffuso nell'agar in prossimità del ceppo produttore). Il risultato negativo è dato invece dalla formazione di un alone di inibizione perfettamente circolare.



**Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.**  
 (1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™, positive result;  
 (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706™, negative result;  
 and (3) a clinical isolate, positive result.

### Figura 2.3 Test di Hodge modificato

(©Clinical and Laboratory Standards Institute, Tests for Carbapenemases).

## 2.6 S1-PFGE

La PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis* – Elettroforesi in campo pulsato) è una metodica utile ad identificare correlazioni genetiche tra isolati di una stessa specie batterica. In particolare, la S1-PFGE è stata utilizzata per definire il numero e le dimensioni dei plasmidi eventualmente presenti negli isolati risultati positivi per la presenza di carbapenemasi.

In breve, i ceppi venivano fatti crescere overnight in BH brodo e diluiti fino a raggiungere una concentrazione di DNA approssimativa di 10 µg/ml. A

questo punto 1 ml della sospensione veniva centrifugato e lavato con 0,5 ml di TEN (Tris EDTA NaCl) Buffer. Il pellet risospeso in 0,5 ml di TEN Buffer era mescolato con un volume identico di low-melting-point agarose (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1,6% e introdotto in appositi stampi (plug-mold) per la creazione delle plug. Una volta solidificate, le plug venivano prima incubate per 24 ore a 37° C in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1 mg/ml) e RNasi A (50 µg/ml) (Sigma) e poi per 24 ore a 50° C in 3 ml di Digestion Buffer contenente proteinasi K (0,5 µg/ml). Le plug venivano quindi lavate 3 volte in 10 ml di TE (Tris EDTA) Buffer. Metà plug veniva incubata overnight con 30 U di S1-nuclease (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. La digestione veniva bloccata aggiungendo 1 ml di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) 0,5 M. Ciascuna plug veniva posta poi su un pettine e inclusa all'interno di un gel di Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) all'1%. Le corse elettroforetiche, in TBE (Tris Borato EDTA) Buffer, sono state effettuate tramite l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Biorad) con le seguenti condizioni: tempo 18 ore, campo 6 V/cm, switch iniziale 0,5 secondi, switch finale 20 secondi, ramping factor lineare. Il gel era infine colorato mediante bromuro d'etidio (0,5 µg/ml) e visualizzato al transilluminatore. Come marker è stato utilizzato il Lambda PFG Ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA).

## ***2.7 Estrazione DNA da sedimento***

Per l'estrazione di DNA da campioni di sedimento è stato utilizzato il kit d'estrazione di DNA "*DNeasy Power Soil Pro Kit*" (Qiagen).

Dopo aver pesato 250 mg di sedimento, questi andavano aggiunti alle PowerBead pro-tubes, provette contenenti delle piccole sfere che dopo l'aggiunta ulteriore di 800 µl di soluzione di lisi CD1, permettono la rottura della parete cellulare, mediante l'utilizzo del vortex per 10 minuti. Inoltre, il tampone permette di disperdere le particelle di suolo, proteggere il DNA dalla degradazione, e neutralizzare gli acidi umici (sostanze che si formano a seguito della biodegradazione microbica, e che si trovano nel suolo e nelle acque).

Si trasferivano quindi le provette in bagnetto termostato a 72°C per 5 minuti, e si vortexavano per 2 minuti. Si ripeteva poi l'intera operazione, e si centrifugava per 1 minuto a 15.000 g. Si procedeva poi col prelevare da ogni provetta circa 500-600 µl di sovrinatante per trasferirlo in provette Microcentrifuge Tubes da 2 ml. Dopo l'aggiunta di 200 µl di soluzione CD2 si vortexava per 5 secondi. Tale operazione permette di "purificare" il campione, poiché la soluzione fa sì che i composti che possono interferire con la purezza del DNA quali sostanze umiche, proteine e detriti cellulari, precipitino dopo centrifugazione, per 1 minuto a 15.000 g. Il sovrinatante

andava poi trasferito in nuove provette Microcentrifuge Tube da 2 ml, ad ognuna delle quali venivano aggiunti 600  $\mu$ l di soluzione CD3 e si vortexava quindi per 5 secondi. La CD3 è una soluzione ad alta concentrazione salina, che promuove l'adesione del DNA alla membrana in silice presente nelle provette MB Spin Column. Infatti, l'acido nucleico può legarsi a tale membrana solo ad alte concentrazioni di sali. Successivamente, si introducevano 650  $\mu$ l di ogni lisato in provette MB Spin Column e si centrifugava per 1 minuto a 15.000 g. Dopo aver eliminato l'eluato dal fondo della provetta, si ripeteva il passaggio precedente, per assicurarsi che il contenuto del lisato fosse passato completamente attraverso la membrana. La colonnina con membrana veniva poi inserita all'interno di una provetta Collection Tube da 2 ml, e si aggiungevano quindi 500  $\mu$ l di soluzione EA. L'aggiunta di questo buffer e relativa centrifugazione per 1 minuto a 15.000 g permetteva l'eliminazione dalla membrana di eventuali residui contaminanti. Dopo aver svuotato la provetta e riposto la membrana nella stessa Collection Tube, andavano aggiunti 500  $\mu$ l di soluzione C5 (centrifuga per 1 minuto a 15.000 g). Grazie a questa soluzione a base di etanolo venivano rimossi residui salini, acidi umici ed altri contaminanti garantendo l'adesione del DNA alla membrana in silicio. Eliminato l'eluato e sostituita la Collection Tube, si centrifugava per 2 minuti a 16.000 g. Quest'ultima operazione

garantiva l'eliminazione di residui di C5, ed è molto importante poiché l'etanolo contenuto nella soluzione potrebbe interferire con successive analisi quali PCR, Elettroforesi o quantificazione mediante Nanodrop.

La membrana in silicio andava trasferita in una provetta Elution Tube da 1.5 ml ed aggiunti 50-100  $\mu$ l di soluzione C6 al centro della membrana: in questo modo ci si assicura che l'intera membrana sia bagnata dal buffer. Esso permette il distacco del DNA dal sale, e quindi il suo passaggio attraverso la membrana in silicio, poiché ora non è più capace di rimanervi adeso. La membrana può essere infine rimossa, ed il DNA veniva così raccolto nella Elution Tube, pronto per essere processato. I campioni venivano conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***2.8 Estrazione del DNA da colture pure***

I ceppi di *E. coli* cresciuti su terreni selettivi come MacConckey addizionato ad ertapenem 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , venivano sottoposti ad analisi molecolare per valutare la produzione di carbapenemasi, dopo procedura di estrazione del DNA. Quest'ultima prevedeva l'allestimento di una coltura in 3 ml di brodo BH; i ceppi venivano poi fatti crescere overnight a  $37^{\circ}\text{C}$ . Il giorno seguente, 1 ml prelevato da ogni coltura e disposto in eppendorf, veniva vortexato per



qualche secondo e centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti. Successivamente si procedeva con l'eliminazione del sovrantante e l'aggiunta di 1 ml di buffer STE (Tris 1M pH 8.0 + NaCl 5M + EDTA 0.5 M pH 8.0), il 20% di saccarosio, e 2.5 mg/ml di lisozima; seguiva un'incubazione in bagnetto termostato a 37°C per 30 minuti e centrifuga a 13000 rpm per 5 minuti.

Dopo aver rimosso il sovrantante, il pellet veniva risospeso in 1 ml di tampone di lisi (KCl 1M + Tris 1M + gelatina 2% + Nonidet P-40 + Tween 20 + Proteinasi K 20mg/ml), ed incubato a 60°C per 30 minuti. Seguiva poi una nuova incubazione a 95°C per 10 minuti per inattivare eventuali proteasi e denaturare il DNA, poi i campioni venivano posti immediatamente in ghiaccio.

## ***2.9 Saggi di PCR per la ricerca di ceppi produttori di carbapenemasi***

I ceppi di *E. coli* che si presentavano resistenti ai saggi di sensibilità sono stati sottoposti a saggi di PCR per la ricerca dei geni *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub> che codificano la produzione delle carbapenemasi di tipo KPC, OXA-48, VIM, NDM ed IMP.

In Tabella 2.1 è riportata la composizione della miscela di reazione (Mix) con le rispettive concentrazioni dei singoli reagenti, utilizzata in tutti i suddetti saggi di PCR. I primer utilizzati e i programmi di amplificazione sono riportati in Tabella 2.2.

<b>MIX</b>	<b>VOLUME FINALE (25 µl)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18.5 µl
<b>Buffer</b>	2.5 µl
<b>dNTP</b>	0.5 µl
<b>DreamTaq Polimerasi</b>	0.2 µl
<b>Primer Forward</b>	0.15 µl
<b>Primer Reverse</b>	0.15 µl
<b>DNA (campione)</b>	3 µl

**Tabella 2.1** Miscela di reazione: volumi.

PRIMER	GENE TARGET	SEQUENZA (5'-3')	DIMENSIONI AMPLIFICATO	PROGRAMMA AMPLIFICAZ.	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
OXA-F	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<b>438 bp</b>	<u>94°C 4:00</u> 94°C 00:30 58°C 00:30 72°C 00:30 <hr/> 72°C 5:00	Poirel et al., 2011
OXA-R		CATCAAGTTCAACCCAACCG			
NDM-F	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	GGTTTGCGGATCTGGTTTTTC	<b>621 bp</b>	<hr/> 72°C 5:00	
NDM-R		CGGAATGGCTCATCACGATC			
KPC-F	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<b>798 bp</b>	<u>94°C 00:30</u> 94°C 00:30 58°C 00:30 72°C 1:00 <hr/> 72°C 5:00	
KPC-R		CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			
VIM-F	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GATGGTGTGGTTCGCATA	<b>390 bp</b>	<u>94°C 00:30</u> 94°C 00:30 54°C 00:30 72°C 00:30 <hr/> 72°C 5:00	
VIM-R		CGAATGCGCAGCACCAG			
IMP-F	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	<b>232 bp</b>	<u>94°C 00:30</u> 94°C 00:30 52°C 00:30 72°C 00:30 <hr/> 72°C 5:00	
IMP-R		GGTTTAAAYAAAACAACCACC			

**Tabella 2.2** Primer utilizzati e dimensioni degli amplificati

Dopo le reazioni di PCR, gli amplificati venivano analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% addizionato a Gel Red®Biotium (a concentrazione 0.1µl/ml) in TAE 1X (Tris-acetato 40 Mm; EDTA 1 mM, pH 8.0) a 80-90 V per circa 45 minuti. Come peso molecolare standard veniva utilizzato il GeneRuler™ 100bp plus (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia).

### ***2.10 Purificazione e quantificazione degli amplificati di PCR***

Per la *purificazione* degli amplificati di PCR è stato utilizzato il kit “*GenElute PCR Clean-Up*” (Sigma-Aldrich), che separa il DNA amplificato sulla base di metodi cromatografici. Il kit prevede l’utilizzo di colonnine (GenElute plasmid mini spin column, Sigma-Aldrich) la cui resina trattiene l’amplificato separandolo dai componenti della miscela di reazione. Le colonnine venivano inserite in apposite eppendorf, venivano aggiunti 500 µl di Column Preparation Solution, si centrifugava a 12.000 rpm per 1 minuto e l’eluato veniva eliminato. Intanto in una nuova eppendorf si preparava il campione da purificare, aggiungendo 200 µl di Binding solution a 40 µl di prodotto di PCR e questa soluzione veniva trasferita nella colonnina. Dopo una centrifugazione

di 1 minuto a 13.000 rpm veniva eliminato l'eluato e si aggiungevano 500  $\mu$ l di Wash Solution. Si centrifugava ancora a 13.000 rpm per un minuto, per allontanare i componenti non legati alla resina, quindi si toglieva l'eluato e si centrifugava a 13.000 rpm per 2 minuti, per eliminare l'eccesso di etanolo. A questo punto le colonnine venivano trasferite in nuove eppendorf, e venivano aggiunti 50  $\mu$ l di Elution Solution, si centrifugava a 13.000 rpm per 1 minuto in modo da eluire il DNA amplificato legato alla matrice cromatografica.

Per la *quantificazione* del DNA è stato utilizzato il NanoDrop. Per prima cosa si procedeva col pulire le superfici ottiche superiori e inferiori (sensori) bagnandole con 2  $\mu$ l di acqua sterile. Dopo aver aperto il software NanoDrop e selezionato l'applicazione per acido nucleico, si dispensavano 2  $\mu$ l di tampone C6 sulla superficie ottica inferiore per eseguire una misurazione del bianco.

Si effettuavano 3 misurazioni per ogni campione prelevando ogni volta 2  $\mu$ l di soluzione. Il risultato della misurazione veniva espresso in ng/ $\mu$ l (la concentrazione ottimale sarebbe un valore di circa 20 ng/ $\mu$ l) nella schermata del pc associato al macchinario. Delle 3 misurazioni si procedeva col fare poi una media. Gli altri valori presenti nella schermata ci permettevano di valutare la purezza del campione:

- ✓ Rapporto A260/A280: indice di contaminazione proteica. Il valore per il DNA è compreso tra 1.6 ed 1.8, valori superiori indicano contaminazione da proteine.
- ✓ Rapporto A260/A230: indice di contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi). Il valore ottimale è di circa 2.2, valori inferiori indicano contaminazione da solventi.

Il sequenziamento genomico è stato eseguito mediante Next Generation Sequencing usando la tecnologia Illumina Miseq con reads 2x250bp. L'assemblaggio delle reads è stato eseguito mediante i software abyss (<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss>) e SPAdes (<http://bioinf.spbau.ru/spades>). I risultati sono stati analizzati mediante i software BLAST, ORF Finder, RAST (<http://rast.nmpdr.org>), ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>).

### ***2.11 Identificazione mediante sistema miniaturizzato***

L'identificazione è stata effettuata utilizzando il kit "Enterosystem 24R" (Liofilchem), un sistema a 24 pozzetti (Figura 2.3) contenenti substrati biochimici essiccati per l'identificazione dei batteri Gram-negativi (e ossidasi-negativi) appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Il microrganismo da identificare veniva isolato per 18-24 ore su MacConkey Agar, per poi prelevare una o più colonie morfologicamente simili e ben isolate e risospenderle in una delle fiale di soluzione fisiologica comprese nel kit ad una concentrazione di 0.5 McFarland. Veniva prelevato quindi un sistema dal suo involucro e si portava a temperatura ambiente; successivamente si trasferiva un dischetto di Arabinose Disc ed uno di Xylose Disc, entrambi compresi nel kit, rispettivamente nei pozzetti 17 -ARA e 23-XYL. Si procedeva quindi col dispensare 0.2 ml di sospensione batterica in ciascun pozzetto del sistema (questo passaggio provvede a ricostituire il terreno disidratato contenuto all'interno del pozzetto) per poi coprire con 2 gocce di olio di vaselina i pozzetti 2-LDC, 3-ODC, 4-ADC, 7-UR e 8- H2S. Si copriva infine il sistema con l'apposito coperchio e si incubava in termostato a 37°C per 18 - 24 ore.

Il giorno seguente venivano aggiunte: 2 gocce di Alfa-Naftolo ed 1 goccia di NaOH 40% nel pozzetto 10 - VP (attendendo 15-20 minuti dall'aggiunta dei

reagenti prima di eseguire lettura); 2 gocce di reagente di Kovac nel pozzetto 11- IND (attendendo 1-2 minuti dall'aggiunta del reagente prima di eseguire lettura). La lettura consisteva nell'osservazione del cambiamento di colore nei pozzetti ed interpretazione dei risultati servendosi della Tabella Interpretativa (Figura 2.3). Si trascriveva quindi il risultato sul modulo raccolta dati per formare il codice numerico a 8 cifre seguendo le istruzioni del kit. Il microorganismo veniva identificato servendosi del Software Identificativo ([http://www.liofilchem.net/software/code\\_disk/code.php](http://www.liofilchem.net/software/code_disk/code.php)).



Pozzetto	Test	Colore pozzetto	
		Reazione positiva	Reazione negativa
1-ONPG	Idrolisi ONPG	giallo	incolore
2-LDC	Decarbossilazione lisina	rosso	giallo-arancio
3-ODC	Decarbossilazione ornitina	rosso	giallo-arancio
4-ADC	Decarbossilazione arginina	rosso	giallo-arancio
5-PD	Deaminazione fenilalanina	nero-marrone	giallo
6-CIT	Utilizzazione citrato	blu-verde scuro	verde chiaro
7-UR	Idrolisi urea	rosso-fucsia	giallo-arancio
8-H <sub>2</sub> S	Produzione idrogeno solforato	nero	giallo
9-MLN	Utilizzazione malonato	blu-verde	giallo
10-VP	Voges-Proskauer (aggiunta reagenti)	rosa-rosso	giallo
11-IND	Indolo (aggiunta reagente di Kovac)	anello rosso	giallo
12-GLU	Glucosio	giallo	blu-verde
13-MAN	Mannitolo	giallo	blu-verde
14-INO	Inositolo	giallo	blu-verde
15-SOR	Sorbitolo	giallo	blu-verde
16-SAC	Saccarosio	giallo	blu-verde
17-ARA	Arabinosio	giallo	blu-verde
18-RAF	Raffinosio	giallo	blu-verde
19-RAM	Ramnosio	giallo	blu-verde
20-MEL	Melibiosio	giallo	blu-verde
21-LAC	Llattosio	giallo	blu-verde
22-TRE	Trealosio	giallo	blu-verde
23-XYL	Xilosio	giallo	blu-verde
24-DUL	Dulcitolio	giallo	blu-verde

**Figura 2.3 Sinistra:** sistema a 24 pozzetti Liofilchem® - Enterosystem 24R. **Destra:** Tabella interpretativa Liofilchem® - Enterosystem 24R.



### 3. RISULTATI

#### 3.1 Isolamento dei ceppi cresciuti su terreno selettivo

##### 3.1.1 Determinazione della MIC

Gli isolati cresciuti su MacConkey addizionato con ertapenem 0.5 µg/ml venivano sottoposti alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) per ertapenem (testato nel range 0.006 – 8µg/ml), in quanto sospetti produttori di carbapenemasi, e successivamente al Test di Hodge. Nella tabella che segue (Tabella 3.1), vengono riportati i 117 isolati (62 da aziende zootecniche, 34 da molluschi e 21 da campioni marini, cioè zooplancton, acqua e sedimento) cresciuti su terreno selettivo, indicando la loro matrice di provenienza i rispettivi valori delle MIC e i risultati del Test di Hodge.

CAMPIONE	SIGLA	MIC(µg/ml)	T. HODGE
Feci suine	FS13	0.12	-
Feci suine	FS14(1)	0.12	-
Feci suine	FS14(2)	0.12	-
Feci suine	FS15(1)	0.12	-
Feci suine	FS15(2)	0.12	-
Feci suine	FS15(3)	0.12	-
Feci suine	FS15(4)	0.12	-
Feci suine	FS15(5)	0.12	-
Feci suine	FS17	0.12	-
Feci suine	FS21	2	-
Feci suine	FS22(1)	4	-

<b>Feci suine</b>	FS22(2)	4	-
<b>Feci suine</b>	FS24(1)	0.12	-
<b>Feci suine</b>	FS24(2)	0.12	-
<b>Feci suine</b>	FS25(1)	0.12	-
<b>Feci suine</b>	FS25(2)	0.12	-
<b>Feci suine</b>	FS25(3)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS13	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS14(1)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS14(2)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS16(1)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS16(2)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS16(3)	0.5	-
<b>Carne suina</b>	CS16(4)	0.5	-
<b>Carne suina</b>	CS16(5)	1	-
<b>Carne suina</b>	CS18(1)	1	-
<b>Carne suina</b>	CS18(2)	1	-
<b>Carne suina</b>	CS18(3)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS18(4)	1	-
<b>Carne suina</b>	CS18(5)	1	-
<b>Carne suina</b>	CS23	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS24(1)	0.12	-
<b>Carne suina</b>	CS24(2)	0.12	-
<b>Feci bovine</b>	FB12	0.12	-
<b>Feci bovine</b>	FB13	0.12	-
<b>Feci bovine</b>	FB17	0.12	-
<b>Feci bovine</b>	FB21	4	-
<b>Feci bovine</b>	FB23	4	-
<b>Carne bovina</b>	CB12	0.12	-
<b>Carne bovina</b>	CB13	0.12	-
<b>Carne bovina</b>	CB19	0.12	-
<b>Carne bovina</b>	CB23	0.12	-
<b>Rene suino</b>	RES16(1)	0.12	-
<b>Rene suino</b>	RES16(2)	0.5	-
<b>Rene suino</b>	RES16(3)	0.5/1	-
<b>Rene suino</b>	RES16(4)	0.5	-
<b>Rene suino</b>	RES16(5)	1	-
<b>Fegato suino</b>	FES16(1)	0.12	-
<b>Fegato suino</b>	FES16(2)	0.5	-
<b>Fegato suino</b>	FES16(3)	0.12	-
<b>Fegato suino</b>	FES16(4)	0.12	-
<b>Fegato suino</b>	FES16(5)	4	+
<b>Mangime suino</b>	MS15	1	-
<b>(sfarinato di cereali)</b>			
<b>Mangime suino</b>	MS22	4	-
<b>(sfarinato di cereali)</b>			
<b>Mangime bovino</b>	MB17	0.12	-
<b>(fieno di medica)</b>			

<b>Salame di fegato</b>	SAL13	0.12	-
<b>Salame</b>	SAL19	0.12	-
<b>Salame</b>	SAL20	0.12	-
<b>Pancetta</b>	PAN20	0.12	-
<b>Lonza</b>	LON20	0.12	-
<b>Formaggio</b>	FOR13	0.12	-
<b>Formaggio</b>	FOR19	0.12	-
<b>Molluschi</b>	7092-1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	7092-3A	0.12	-
<b>Molluschi</b>	7092-3B	0.12	-
<b>Molluschi</b>	6415/1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	6415/4	0.12	-
<b>Molluschi</b>	6416	0.12	-
<b>Molluschi</b>	17087 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	17087 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	17089 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	17089 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	17093	0.12	-
<b>Molluschi</b>	15235	0.12	-
<b>Molluschi</b>	18417	0.12	-
<b>Molluschi</b>	23994 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	23999 A2	8	+
<b>Molluschi</b>	24002 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	24002 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	26279 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	26282 A4	0.12	-
<b>Molluschi</b>	26288 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	26290 A4	0.25	-
<b>Molluschi</b>	27919 A3	1	-
<b>Molluschi</b>	27923 A1	0.25	-
<b>Molluschi</b>	27931 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	27933 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	27935 A1	0.12	-
<b>Molluschi</b>	27949 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	27951 A2	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31400	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31396	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31366	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31393	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31367	0.12	-
<b>Molluschi</b>	31387	0.12	-
<b>Sedimento</b>	HSCE1	2	-
<b>Sedimento</b>	ISCE1	2	-
<b>Sedimento</b>	JSCE1	8	+
<b>Sedimento</b>	LSCE1	2	-
<b>Sedimento</b>	OSCE1	1	+
<b>Sedimento</b>	QSCE1	8	+

Acqua	HACE1	2	-
Acqua	JACE1	1	+
Acqua	KACE1	2	-
Acqua	KACE2	2	+
Acqua	LACE1	2	+
Zooplancton	HZCE1	2	-
Zooplancton	HZCE2	0.5	+
Zooplancton	JZCE1	2	+
Zooplancton	JZCE2	2	-
Zooplancton	JZCE3	0.5	+
Zooplancton	KZCE1	0.5	+
Zooplancton	MZCE1	2	+
Zooplancton	NZCE1	2	+
Zooplancton	QZCE1	8	+
Zooplancton	RZCE1	8	+

**Tabella 3.1** Valori di MIC per ertapenem e risultati del test di Hodge dei campioni in esame.

Analizzando i risultati e facendo riferimento ai valori di sensibilità e resistenza possiamo evidenziare quanto segue:

✓ **CAMPIONI DA AZIENDE ZOOTECNICHE**

a) FECCI → la quasi totalità degli isolati (77.27%) mostrava sensibilità all'antibiotico con una MIC di 0.12 µg/ml, mentre solo il 22.73% risultava resistente e possedeva una MIC ≥ 1 µg/ml.

b) CARNI → l'80% degli isolati da carni lavorate e/o appena macellate, sia bovine che suine, evidenziava sensibilità all'ertapenem, con MIC che andavano da 0.12 a 0.5 µg/ml ed il 20% appariva resistente.

c) FEGATO E RENE → su 10 ceppi, il 70% evidenziava sensibilità all'antibiotico (MIC 0.12-0.5 µg/ml), contro il 30%, rappresentato da tre isolati che mostravano resistenza, con una MIC compresa tra 1 e 4 µg/ml.

✓ CAMPIONI DI MOLLUSCHI

Tra i 34 isolati da molluschi, ben i 94.11% risultava sensibile all'ertapenem (MIC da 0.12 a 0.25 µg/ml), ed due soli ceppi mostravano resistenza, con MIC rispettivamente di 1 ed 8 µg/ml.

✓ CAMPIONI DI ACQUA, SEDIMENTO E ZOOPLANCTON

La percentuale di isolati sensibili all'ertapenem in questo caso risultava bassa, poiché soltanto il 14.3% (cioè 3 ceppi su 21) riportava una MIC di 0.5 µg/ml. I ceppi resistenti (18 isolati) invece rappresentavano l' 85.7%, con una MIC compresa tra 1 ed 8 µg/ml.

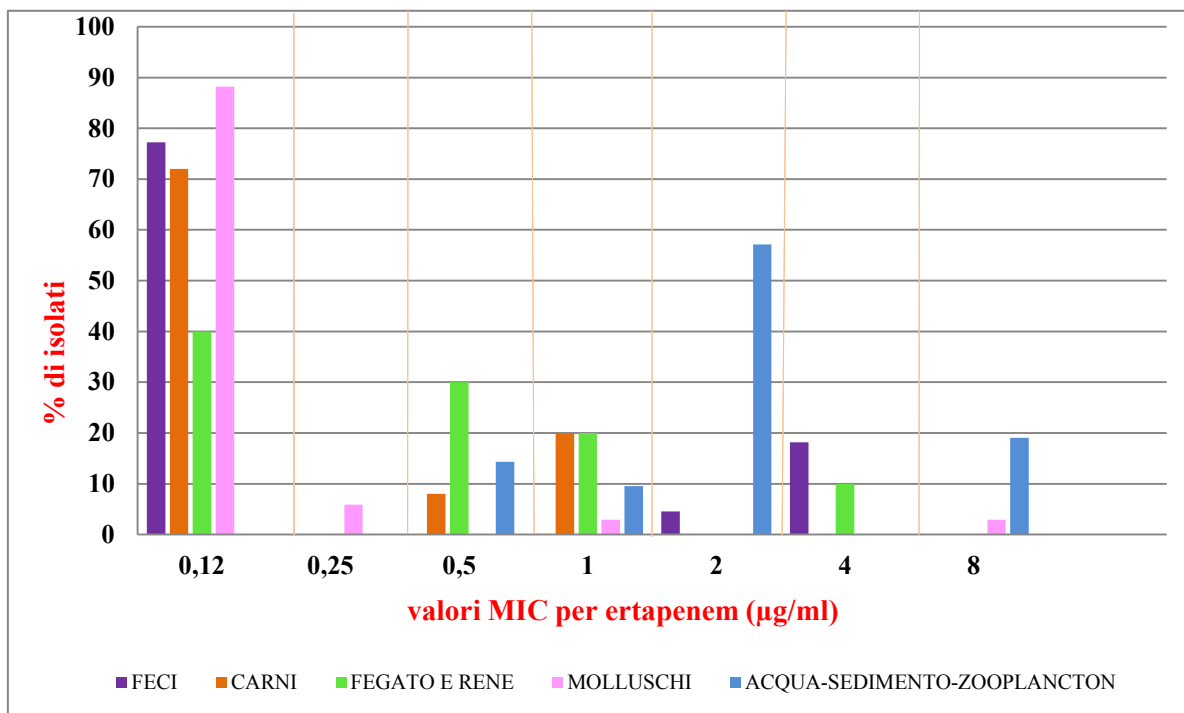
Dai risultati appena discussi quindi, possiamo evincere che i ceppi con una percentuale maggiore di resistenza risultavano essere quelli appartenenti alla categoria “sedimento-acqua-zooplancton”; non solo: essi mostravano mediamente valori più alti di MIC rispetto agli isolati delle altre categorie. Di fatto, il 19.05% degli isolati sedimento-acqua-zooplancton presentava un

valore di MIC di 8 µg/ml, mentre nelle altre categorie questa percentuale risultava nulla, tranne che per i molluschi nei quali era comunque del 2.94%. Infine, ben il 57.14% presentava una MIC di 2 µg/ml, a differenza della categoria “FECI” che riporta una percentuale del 4.54%, mentre nelle altre categorie la percentuale è pari a zero. Per la categoria “FECI”, invece, riscontriamo la percentuale più alta di resistenze col valore di 4 µg/ml, poiché è del 18.18% su 22 isolati; per la categoria “FEGATO E RENE” riscontravamo invece una percentuale del 12.5%, ma su 10 isolati.

Il grafico mostrato in Figura 3.1 riporta la distribuzione degli isolati provenienti dalle diverse matrici in rapporto ai loro valori di MIC per l’ertapenem. Il numero degli isolati è espresso in valore percentuale.

Nel grafico troviamo *5 categorie di isolati*, denominati come segue:

- ✓ FECI → tutti i campioni di feci, sia bovine che suine;
- ✓ CARNI → tutti i campioni di carni lavorate e/o appena macellate, sia bovine che suine;
- ✓ FEGATO E RENE → tutti i campioni di fegato e rene di bovini e suini;
- ✓ ACQUA E SEDIMENTO → tutti i campioni di acqua, sedimento e zooplancton;
- ✓ MOLLUSCHI.



**Figura 3.1** Valori di MIC per ertapenem nelle varie categorie di isolati.

Nell'ambito delle cinque categorie in cui abbiamo incluso gli isolati sono state determinati anche i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, ovvero il valore di MIC per l'ertapenem in grado di inibire rispettivamente il 50% e il 90% degli isolati (Tabella 3.2). Vengono anche riportati i valori di MIC dell'ertapenem minimo e massimo, ottenuti per ogni categoria.

CATEGORIA	RANGE	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
FECI	0.12-4	0.12	0.12
CARNI	0.12-1	0.12	0.12
FEGATO E RENE	0.12-4	0.50	1
MOLLUSCHI	0.12-8	0.12	0.12
ACQUA E SEDIMENTO	0.5-8	2	8

**Tabella 3.2** MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> delle 5 categorie di campioni.

### ***3.1.2 Risultati del Test di Hodge***

Come già accennato, il Test di Hodge, utile per la determinazione dell'effettiva produzione di carbapenemasi, è stato effettuato su tutti gli isolati cresciuti su terreno selettivo, e quelli risultati positivi, riportati anche in Tabella 3.1 sono i seguenti:

- ✓ L'isolato *FES16(5)*, proveniente da fegato di suino, che riportava una MIC di 4 µg/ml;
- ✓ L'isolato *23999 A2* proveniente da un campione di molluschi, che riportava una MIC di 8 µg/ml;



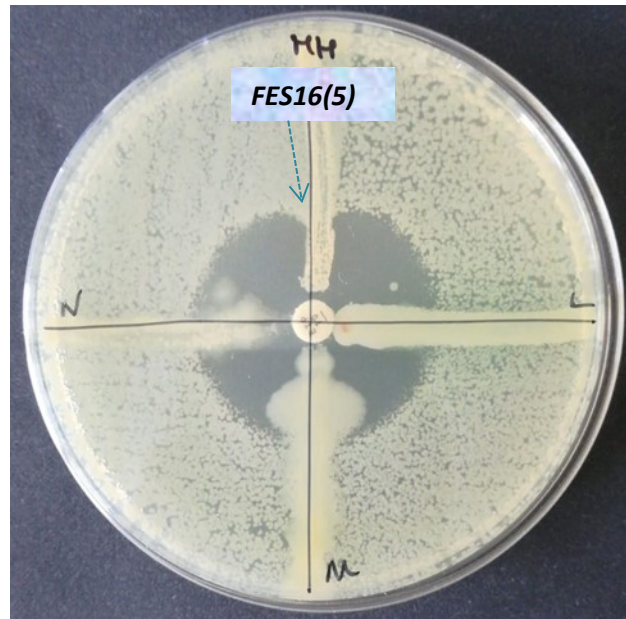
✓ I seguenti 14 isolati derivati da campioni di sedimento, acqua e zooplancton:

a) SEDIMENTO → *JSCE1*, *OSCE1*, *QSCE1*;

b) ACQUA → *JACE1*, *KACE2*, *LACE1*;

c) ZOOPLANCTON → *HZCE2*, *JZCE1*, *JZCE3*, *KZCE1*, *MZCE1*, *NZCE1*, *QZCE1*, *RZCE1*.

Nella Figura 3.2 è rappresentato il risultato del Test di Hodge per l'isolato *FES16(5)*: come possiamo notare, a differenza degli altri tre ceppi analizzati nel medesimo test solo il ceppo *FES16(5)* mostra positività. Il ceppo di controllo *E. coli* ATCC 25922 sensibile a ertapenem riesce a crescere nella zona di intersezione con i ceppi testati (strisciati dal dischetto verso l'esterno) solo se questi sono produttori di carbapenemasi, come *FES16(5)*, provocando la distorsione del suo alone di inibizione.

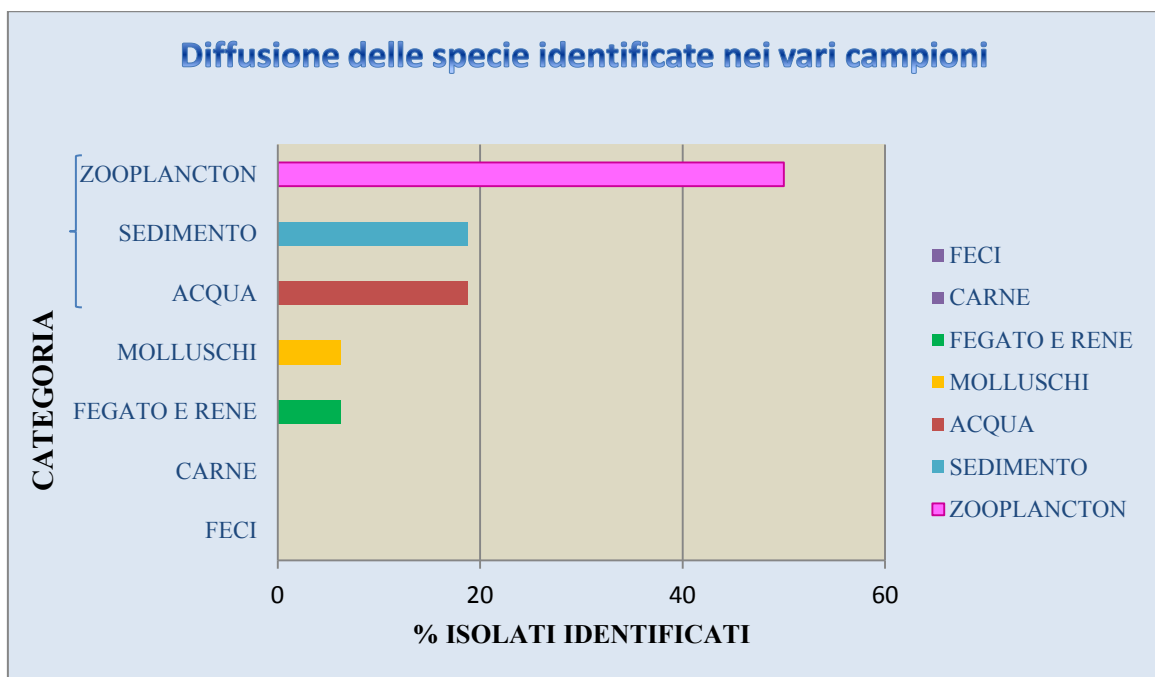


**Figura 3.2** Positività all'Hodge test dell'isolato *FES16(5)*.

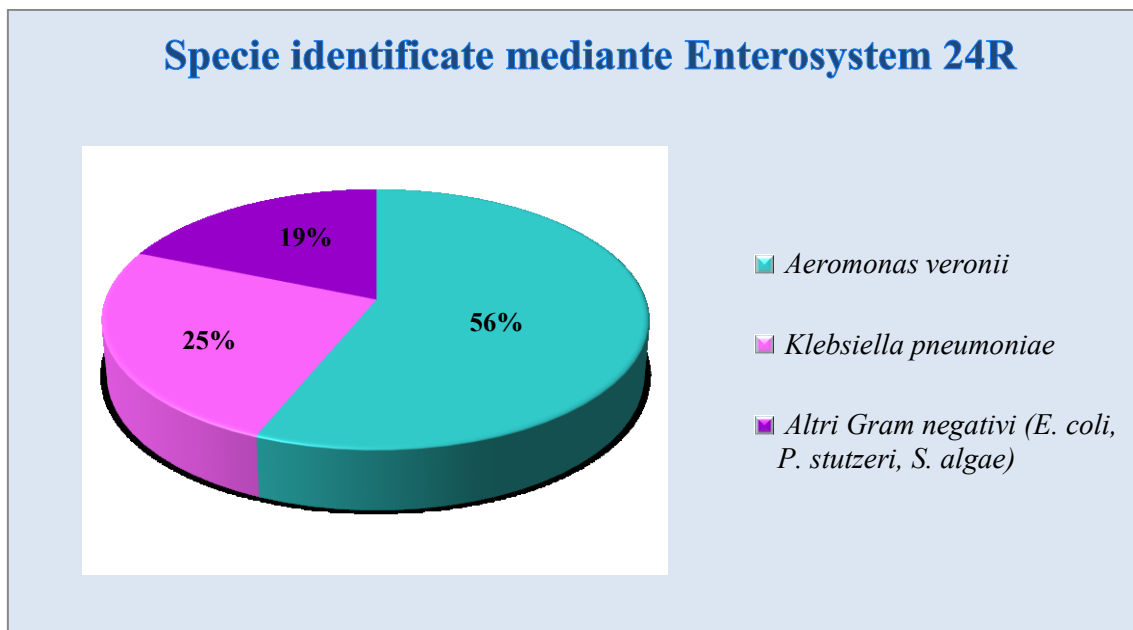
### ***3.2 Identificazione ed indagini molecolari***

I ceppi positivi al test di Hodge che risultavano resistenti ad ertapenem in base alla MIC erano in totale 16, di cui 14 dalla categoria “acqua-sedimento-zooplankton”, 1 da molluschi e 1 da fegato suino (in Figura 3.3 troviamo un rapporto percentuale). I 16 ceppi venivano identificati mediante sistema miniaturizzato Enterosystem 24R (Liofilchem), Il ceppo *FES16(5)* isolato da fegato suino apparteneva alla specie *Aeromonas veronii*. L'isolato 23999 A2 isolato da molluschi invece, dopo identificazione mediante Enterosystem 24R, si è rivelato essere un ceppo appartenente alla specie *Klebsiella pneumoniae*,

come pure gli isolati *QZCE1* e *RZCE1* da zooplancton e l'isolato *KACE2* da acqua. I rimanenti 11 isolati, tutti da sedimento, acqua e zooplancton sono stati identificati, sempre come batteri Gram-negativi appartenenti alle specie *Escherichia coli* (1), *Pseudomonas stutzeri* (1), *Shewanella algae* (1), e *Aeromonas veronii* (8). Nel grafico a torta (Figura 3.4) è riportata la prevalenza (%) in termini di specie dei 16 ceppi carbapenemasi produttori.

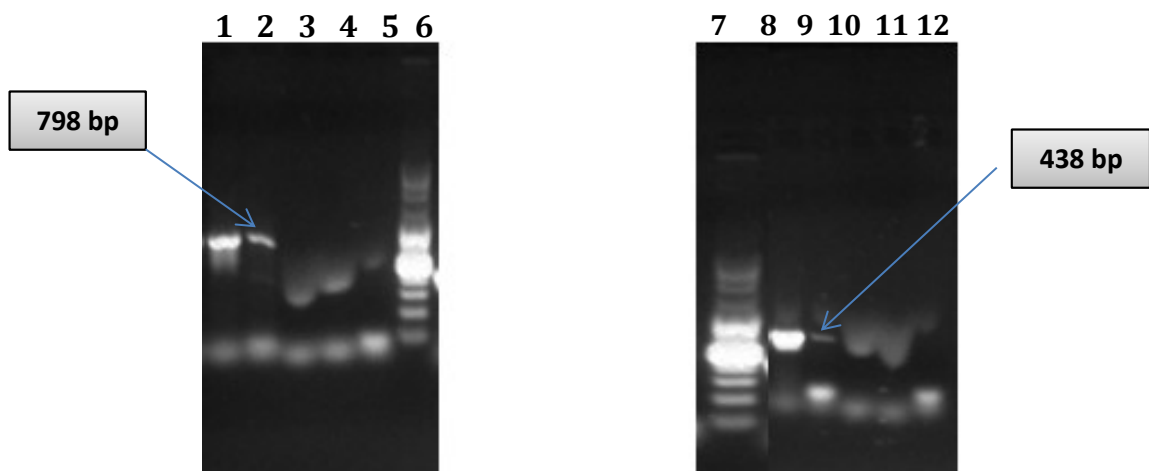


**Figura 3.3** Percentuali di diffusione nelle diverse categorie dei 16 isolati identificati, con diversificazione all'interno della categoria "acqua-sedimento-zooplancton".



**Figura 3.4** Prevalenza delle specie resistenti ai carbapenemi dopo identificazione mediante Enterosystem 24R.

Dopo l'identificazione, i 16 ceppi resistenti venivano sottoposti a procedura d'estrazione del DNA e successiva indagine molecolare mediante PCR, per valutare la presenza dei geni codificanti per le 5 carbapenemasi più comuni, ovvero *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>. Quest'ultima analisi ha evidenziato la presenza del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> nell'isolato *Aeromonas veronii* FES16(5) e del gene *bla*<sub>KPC</sub> nell'isolato *K. pneumoniae* 23999 A2 (Figura 3.5); mentre i 14 isolati da sedimento, acqua e zooplancton sono risultati negativi per tutti i geni testati.



**Figura 3.5** Risultati della PCR per il gene *bla<sub>KPC</sub>* (a sinistra) e *bla<sub>OXA-48</sub>* (a destra) **1)** Controllo positivo per *bla<sub>KPC</sub>*, **2)** *K. pneumoniae* 23999 A2, **3)** *K. pneumoniae* RZCE1, **4)** *K. pneumoniae* QZCE1, **5)** Controllo negativo **6)** e **7)** Marker Ladder Perfect™ 100bp, **8)** Controllo positivo per *bla<sub>OXA-48</sub>*, **9)** *A. veronii* FES16(5), **10)** *K. pneumoniae* RZCE1, **11)** *K. pneumoniae* QZCE1, **12)** Controllo negativo.

Per i 14 isolati identificati, provenienti da sedimento acqua e zooplancton negativi ai geni testati sono ancora in corso ulteriori indagini di approfondimento per indentificare il gene responsabile della resistenza ai carbapenemi, mentre i due ceppi *A. veronii* FES16(5) e *K. pneumoniae* 23999 A2 sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma. A tale scopo il DNA estratto è stato quantificato per inviare al servizio di sequenziamento l'opportuna quantità di DNA necessaria per il sequenziamento (1 µg).

La quantificazione al Nanodrop ha dato i seguenti risultati:

- ✓ *A. veronii* FES16(5) → 25.8 ng/μl;
- ✓ *K. pneumoniae* 23999 A2 → 16.3 ng/μl.

### ***3.3 Risultati del sequenziamento***

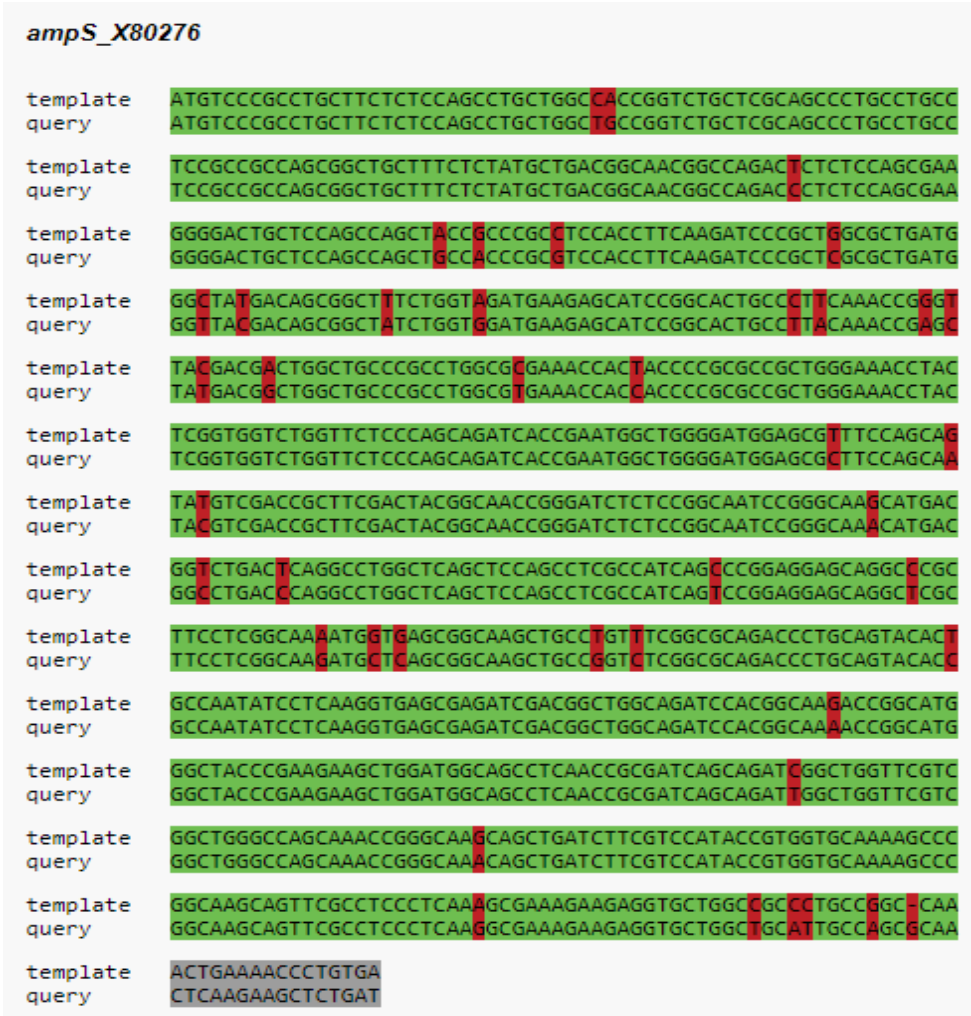
Il sequenziamento del genoma dell'isolato *A. veronii* FES16(5), ha evidenziato la presenza di due geni codificanti per β-lattamasi: *ampS* e *cphA4*. La rilevazione di questi due geni è stata possibile grazie all'algoritmo "ResFinder", presente nel sito del "Centre for Genomic Epidemiology" (CGE) (<http://cge.cdu.dtu.dk/services/ResFinder>). Una volta caricata la sequenza genomica del ceppo *A. veronii* FES16(5), il risultato ottenuto è mostrato in Figura 3.6, che riporta anche la percentuale d'identità con le sequenze presenti nel database (94.62% e 96.46%).

Beta-lactam						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
ampS	94.62	780 / 795	NODE_12_length_131580_cov_147.782340	119686..120465	Beta-lactam resistance	<a href="#">X80276</a>
cphA4	96.46	762 / 765	NODE_6_length_213940_cov_130.762199	200530..201290	Beta-lactam resistance	<a href="#">AY227050</a>

**Figura 3.6** Risultato degli allineamenti effettuati da ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>).

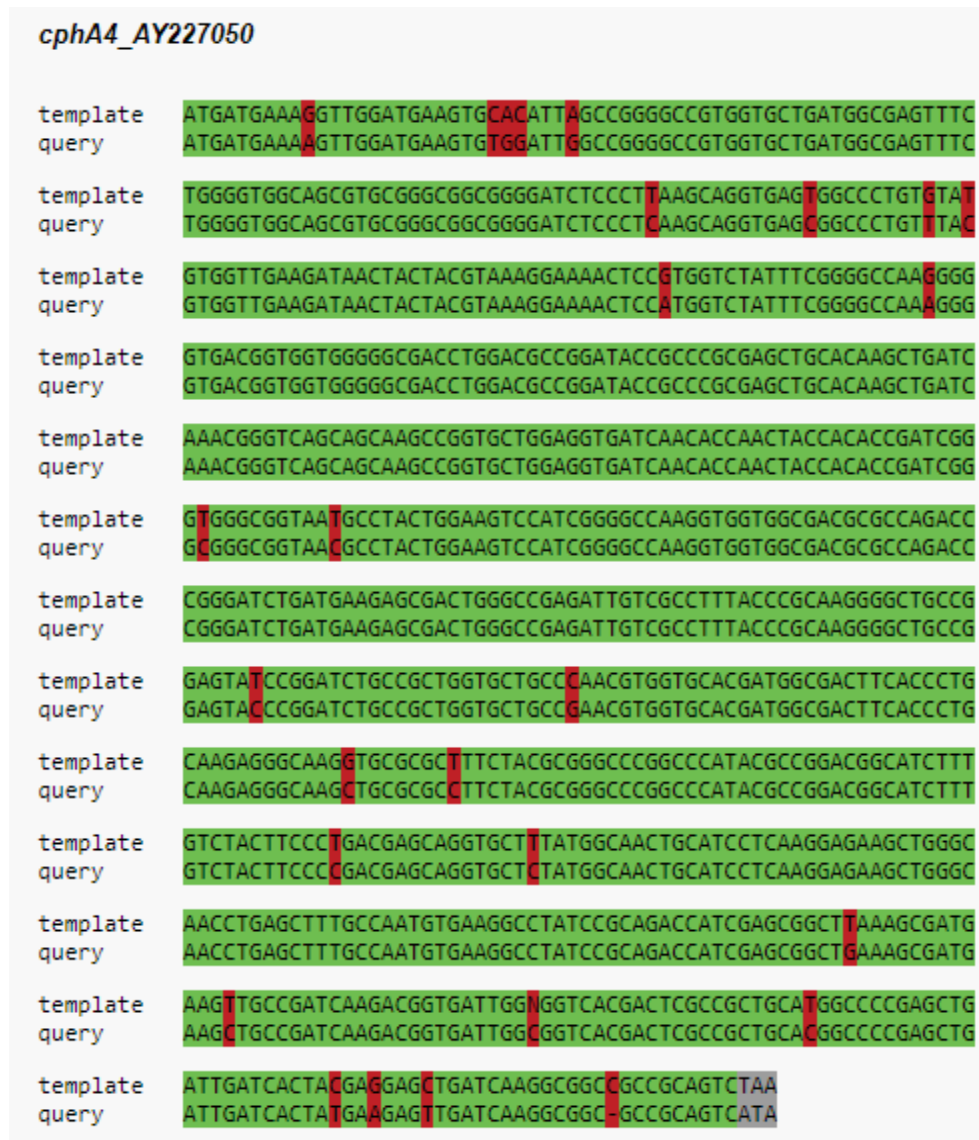
Come possiamo notare, l’algoritmo ci segnala anche il frammento (*contig*) cromosomico su cui si trova ciascun gene e la sua posizione. In Figura 3.6 notiamo anche che sono presenti gli “Accession number”, che ci permettono di risalire alla sequenza nel database con cui è stata trovata la più alta similarità. Queste appartengono rispettivamente ad *Aeromonas sobria* per *ampS* e *Aeromonas allosaccharophila* per *cphA4* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Le Figure 3.7 e 3.8 mostrano il risultato dell’allineamento tra le sequenze nucleotidiche di *ampS* e *cphA4* del nostro ceppo con le rispettive sequenze in banca dati (X80276 e AY227050).



**Figura 3.7** Allineamento della sequenza nucleotidica di *ampS* con il rispettivo gene di *A. sobria* 163a (X80276) (<https://cge.cbs.dtu.dk/>).





**Figura 3.8** Allineamento della sequenza nucleotidica di *cphA4* con il rispettivo gene di *A. allosaccarophila* ATCC 51208 (AY227050). (<https://cge.cbs.dtu.dk/>)

Le sequenze nucleotidiche dei geni *ampS* e *cphA4* del nostro ceppo e dei ceppi di riferimento, sono state convertite in sequenze aminoacidiche con il server Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>), permettendoci così di

valutare non solo le differenze a livello nucleotidico ma anche di verificare cambiamenti nella struttura primaria degli enzimi. L'allineamento delle sequenze aminoacidiche eseguito con l'algoritmo Clustal Omega è riportato nelle figura sottostante (Figura 3.9).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ampS_A.sobria      MSRLLLSLLLATGLLAALPASAAAGCFLYADGNGQTLSEGCSSQLPPASTFKIPLALM      60
ampS_A.veronii    MSRLLLSLLAAGLLAALPASAAAGCFLYADGNGQTLSEGCSSQLPPASTFKIPLALM      60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ampS_A.sobria      GYDSGFLVDEEHPALPFKPGYDDWLPWRETTTPRRWETYSVWVFSQQITEWLGMERFQQ      120
ampS_A.veronii    GYDSGYLVDEEHPALPYKPSYDGWLPWRETTTPRRWETYSVWVFSQQITEWLGMERFQQ      120
*****:*****:*.*.*****:*****:*****:*****:*****:*****

ampS_A.sobria      YVDRFDYGNRDLSGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPEEQARFLGKMSGKLPVSAQTLQYT      180
ampS_A.veronii    YVDRFDYGNRDLSGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPEEQARFLGKMLSGKLPVSAQTLQYT      180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ampS_A.sobria      ANILKVSEIDGWQIHGKTGMGYPKKLDGSLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVVQKP      240
ampS_A.veronii    ANILKVSEIDGWQIHGKTGMGYPKKLDGSLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVVQKP      240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ampS_A.sobria      GKQFASLKAKEEVLAALPAKLLKTL      264
ampS_A.veronii    GKQFASLKAKEEVLAALPAQLKKL      264
*****:*****:*.*.

```

**Figura 3.9** Allineamento tra le sequenze aminoacidiche dell'enzima ampS di *A. veronii* FES16(5) e di ampS di *A. sobria* 163a.

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche di ampS ha evidenziato differenze nella struttura proteica in 8 residui.

Essendo AmpS una  $\beta$ -lattamasi di classe D, appartenente alla famiglia delle oxacillinasi con elevata similarità con OXA-12, nella Figura 3.10 viene mostrato l'allineamento aminoacidico di AmpS con OXA-12 di un ceppo di *A. veronii* (accession number QHC06262). Da questo allineamento si deduce

una elevata omologia tra le proteine che differiscono per un solo aminoacido in posizione 264.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

OXA-12_A.veronii      MSRLLLSLLAAGLLAALPASAASGCFLYADGNGQTLSSSEGDCSSQLPPASTFKIPLALM      60
ampS_A.veronii        MSRLLLSLLAAGLLAALPASAASGCFLYADGNGQTLSSSEGDCSSQLPPASTFKIPLALM      60
*****

OXA-12_A.veronii      GYDSGYLVDEEHPALPYKPSYDGLPAWRETTTPRRWETYSVWVFSQQITEWLGMERFQQ      120
ampS_A.veronii        GYDSGYLVDEEHPALPYKPSYDGLPAWRETTTPRRWETYSVWVFSQQITEWLGMERFQQ      120
*****

OXA-12_A.veronii      YVDRFDYGNRDLSGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPEEQARFLGKMLSGKLPVSAQTLQYT      180
ampS_A.veronii        YVDRFDYGNRDLSGNPGKHDGLTQAWLSSSLAISPEEQARFLGKMLSGKLPVSAQTLQYT      180
*****

OXA-12_A.veronii      ANILKVSEIDGWQIHGKTGMGYPKLDGSLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVWQKP      240
ampS_A.veronii        ANILKVSEIDGWQIHGKTGMGYPKLDGSLNRDQQIGWVFGWASKPGKQLIFVHTVWQKP      240
*****

OXA-12_A.veronii      GKQFASLKAKEEVLAALPAQLKKQ      264
ampS_A.veronii        GKQFASLKAKEEVLAALPAQLKKL      264
*****

```

**Figura 3.10** Allineamento AmpS di *A. veronii* FES16(5) ed OXA-12 di *A. veronii* (QHC06262).

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche di *cphA4* di *A. allosaccarophila* e del nostro ceppo *A. veronii* FES16(5) (Figura 3.11) indica che sono presenti 8 sostituzioni aminoacidiche, in corrispondenza dei seguenti residui: 5, 10, 53, 103, 165, e 252-254. Tuttavia di queste, solo tre (residui 53, 103 e 165) cadono nella regione catalitica dell'enzima; inoltre gli aminoacidi "originali", di natura idrofobica sono sostituiti con aminoacidi simili dal punto di vista della polarità (quelli alle estremità N-terminale e C-terminale,

che quindi non sono compresi nel sito catalitico, sono sostituiti con aminoacidi non simili).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

cphA4_A.veronii          MMKSWMKCGLAGAVVLMASFVGGSVRAAGISLKQVSGPVVYVEDNYVVKENSMVYFGAKG    60
β-lactamase_A.allosaccharophila MMKGWMKCTLAGAVVLMASFVGGSVRAAGISLKQVSGPVVYVEDNYVVKENSMVYFGAKG    60
***.*** *****;*****

cphA4_A.veronii          VTVVGATWTPDTARELHKLIKRVSSKPVLEVINTNYHTDRAGGNAYWKSIGAKVVATRQT    120
β-lactamase_A.allosaccharophila VTVVGATWTPDTARELHKLIKRVSSKPVLEVINTNYHTDRVGGNAYWKSIGAKVVATRQT    120
*****.*****

cphA4_A.veronii          RDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDPLPLVLPNVVHDGDFTLQEGKLRafYAGPAHTPDGIF    180
β-lactamase_A.allosaccharophila RDLMKSDWAEIVAFTRKGLPEYDPLPLVLPNVVHDGDFTLQEGKVRafYAGPAHTPDGIF    180
*****.*****

cphA4_A.veronii          VYFPDEQVLYGNCILKEKLGNLSFANVKAYPQTIERLKAMKLPiKTVIGGHDSPLHGPEL    240
β-lactamase_A.allosaccharophila VYFPDEQVLYGNCILKEKLGNLSFANVKAYPQTIERLKAMKLPiKTVIGGHDSPLHGPEL    240
*****

cphA4_A.veronii          IDHYEELIKAAPQS      254
β-lactamase_A.allosaccharophila IDHYEELIKAAAV      254
*****

```

**Figura 3.11** Allineamento delle sequenze aminoacidiche di *cphA4* di *A. veronii* FES16(5) e *A. allosaccharophila* ATCC 51208 (AY227050) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Il sequenziamento del genoma dell'isolato *A. veronii* FES16(5) rivelava anche l'assenza di plasmidi e l'appartenenza del ceppo ad un Sequence Type nuovo, con varianti alleliche dei 6 geni (*gltA*, *groL*, *gyrB*, *metG*, *ppsA* e *recA*) da definire.

Per quanto riguarda il genoma dell'isolato *K. pneumoniae* 23999A2, ResFinder ci ha permesso di evidenziare nel ceppo la presenza di geni di resistenza a più antibiotici: ai chinoloni (gene *oqxB*), alla fosfomicina (gene *fosA*) ed ai  $\beta$ -lattamici. Riguardo questi ultimi, i geni riscontrati erano *bla*<sub>KPC-3</sub> per la carbapenemasi di tipo KPC-3 e *bla*<sub>SHV-12</sub> per la ES $\beta$ L di tipo SHV-12 che mostravano un'identità di sequenza del 100% con quelli depositati in banca dati. Altri geni di resistenza nei confronti dei  $\beta$ -lattamici erano *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1A</sub>, che codificano rispettivamente per la  $\beta$ -lattamasi OXA-9 di classe D e per l'ES $\beta$ L TEM-1A. Nella figura sottostante (Figura 3.12) sono riportati i risultati ottenuti da ResFinder da cui è possibile notare anche l'associazione dei geni di resistenza ai singoli *contig*. In particolare i due geni *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1A</sub> sono localizzati sullo stesso frammento genomico (*contig* #123), mentre tutti gli altri geni di resistenza (*bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *fosA* e *oqxB*) si trovano su *contig* diversi.

Fosfomicin						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
fosA	83.73	418 / 420	NODE_59_length_33762_cov_80.163188	5410..5826	Fosfomicin resistance	<a href="#">AGDM01000012</a>
Quinolone						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
oqxB	89.13	3137 / 3153	NODE_80_length_14386_cov_53.486826	10623..13759	Quinolone resistance	<a href="#">EU370913</a>
Beta-lactam						
Resistance gene	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number
blaKPC-3	100	882 / 882	NODE_67_length_22506_cov_176.441839	5811..6692	Beta-lactam resistance	<a href="#">HM769262</a>
blaOXA-9	99.88	825 / 825	NODE_123_length_2853_cov_176.110951	1785..2609	Beta-lactam resistance	<a href="#">KQ089875</a>
blaSHV-12	100	861 / 861	NODE_97_length_5809_cov_166.275820	151..1011	Beta-lactam resistance Alternate name; SHV-5-2a	<a href="#">KF976405</a>
blaTEM-1A	99.88	861 / 861	NODE_123_length_2853_cov_176.110951	225..1085	Beta-lactam resistance Alternate name; RblaTEM-1	<a href="#">HM749966</a>

**Figura 3.12** Geni di resistenza trovati nel genoma del ceppo *K. pneumoniae 23999A2*.

I geni *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1A</sub> depositati in banca dati, con i quali sono state paragonate le rispettive sequenze di *K. pneumoniae 23999A2*, derivano rispettivamente dal genoma di *Citrobacter spp.* e da un trasposone di *E. coli*, e come possiamo vedere condividono quasi il 100% d'identità. Infatti come vediamo anche in Figura 3.13, per *bla*<sub>TEM-1A</sub> e *bla*<sub>OXA-9</sub> l'allineamento coi templati porta ad una sola differenza nucleotidica.



**Figura 3.13** Sequenze di *blaOXA-9* e *blaTEM-1* allineate con i geni presenti in banca dati.

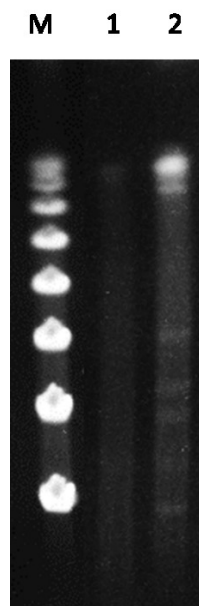
Per quanto riguarda gli altri due geni di resistenza trovati da Res Finder nel genoma di *K. pneumoniae 23999A2*, *fosA* mostrava un 98% di identità con una proteina implicata nella resistenza alla fosfomicina identificata in *K. oxytoca* CAV1374 (CP011636.1); il gene *oqxB* invece codifica per una proteina di efflusso transmembrana coinvolta nella resistenza a diversi antibiotici tra cui i chinoloni. Tale proteina mostrava una identità di sequenza aminoacidica >99% con proteine di efflusso trovate in diversi ceppi del genere *Klebsiella* (es.: WP\_025107946.1)

Il ceppo *K. pneumoniae 23999A2*, come il ceppo di *A. veronii FES16(5)* appartiene ad un Sequence Type nuovo, le cui varianti alleliche dei 7 geni (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) devono essere ancora definite.

Per quanto riguarda invece il contenuto plasmidico, grazie all'algoritmo "Plasmid finder" (<https://cge.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>), presente sul sito CGE è stato possibile individuare nel ceppo almeno tre plasmidi, due appartenenti ai gruppi di incompatibilità IncHI1 e IncFIIK e uno appartenente ad un gruppo plasmidico non identificato. Da sottolineare che il *contig* #67 su cui era presente il gene per la carbapenemasi KPC-3 era il *contig* che portava anche il gene codificante la replicasi (*repA*) del gruppo di incompatibilità plasmidica IncFIIK. Quindi possiamo dedurre che la carbapenemasi KPC-3 in *K. pneumoniae 23999A2* era a codificazione plasmidica e in particolare il plasmide apparteneva al gruppo IncFIIK.

L'analisi mediante S1-PFGE dei due ceppi *A. veronii FES16(5)* e *K. pneumoniae 23999A2* è mostrata nella figura sottostante (Figura 3.14).





**Figura 3.14** S1-PFGE. **M**, Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs); **1**) *A. veronii* FES16(5); **2**) *K. pneumoniae* 23999A2.

Come si può osservare dalla foto si confermava l'assenza di plasmidi nel ceppo di *A. veronii* FES16(5) e almeno 5 plasmidi in *K. pneumoniae* 23999A2: 4 di dimensione compresa tra 50 e 150 kb approssimativamente, e uno più grande di circa 300 kb.

### **3.4 Ulteriori test di sensibilità**

I ceppi *A. veronii* FES16(5) e *K. pneumoniae* 23999A2 produttori di carbapenemasi per la presenza dei geni *cphA4* e *bla<sub>KPC-3</sub>* rispettivamente, sono stati ulteriormente saggiati per valutare il livello di resistenza dei due ceppi a più antibiotici della classe dei carbapenemi. La MIC è stata quindi

determinata per ertapenem, imipenem e meropenem. Il range testato andava da 0.5 a 512 µg/ml, per tutti e tre gli antibiotici. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 3.3.

CEPPO	ERTAPENEM (µg/ml)	IMIPENEM (µg/ml)	MEROPENEM (µg/ml)
<i>A. veronii</i> FES16(5)	256	4	1
<i>K. pneumoniae</i> 23999A2	256	16	8

**Tabella 3.3** Risultati della MIC per ertapenem, imipenem e meropenem di *A. veronii* FES16(5) e *K. pneumoniae* 23999A2

Vediamo che entrambi i ceppi mostravano una resistenza molto alta per l'ertapenem (256 µg/ml). Ma mentre *K. pneumoniae* 23999A2 era resistente anche ad imipenem e meropenem a valori abbastanza alti, il ceppo di *A. veronii* FES16(5) era resistente a basso livello all'imipenem e sensibile a meropenem.

#### 4. DISCUSSIONE

Questo studio si è focalizzato sulla diffusione di batteri Gram-negativi resistenti agli antibiotici carbapenemi (grazie alla produzione di carbapenemasi) in campioni di diversa origine: ambientale, animale ed alimentare. Su un totale di 117 isolati, i ceppi resistenti risultavano essere 33 (28.20%) e tra questi, 16 (13.7% del totale) risultavano positivi al test di Hodge, un test fenotipico in grado di mettere in evidenza la produzione della maggior parte delle carbapenemasi prodotte dai batteri Gram-negativi. I 16 ceppi sono stati quindi identificati e la maggior parte degli isolati non apparteneva alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* che più spesso è associata a questo tipo di resistenza. L'identificazione ha portato infatti alla selezione di 9 ceppi di *Aeromonas veronii*, 4 di *Klebsiella pneumoniae*, 1 di *Pseudomonas stutzeri*, 1 di *Escherichia coli* ed 1 di *Shewanella algae*.

L'analisi degli isolati provenienti da aziende zootecniche marchigiane ha dimostrato che le filiere bovina e suina, non rappresentano per il momento un reservoir per i CPB (perlomeno nella Regione Marche), poiché un solo isolato su 68 è risultato positivo, ed appartenente alla specie *Aeromonas veronii* (il ceppo *FES16(5)*, isolato da fegato di suino).

Il genere *Aeromonas* non fa parte delle *Enterobacteriaceae*, come i maggiori produttori di carbapenemasi, ma comprende bacilli Gram-negativi, aerobi/anaerobi facoltativi, ossidasi-positivi, generalmente mobili, ad habitat acquatico (prevalentemente acque dolci o leggermente salmastre) (Antonelli et al., 2008). Tuttavia, sebbene venga più spesso isolato da fiumi, laghi, acque potabili o sotterranee, lo si ritrova anche in alimenti ed animali, uomo compreso. In quest'ultimo, alcune specie, come *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. caviae*, sono talvolta coinvolte in infezioni di una certa gravità, come gastroenteriti, infezioni respiratorie e persino setticemia, sia in pazienti immunocompromessi che immunocompetenti. I membri del genere *Aeromonas*, hanno sviluppato un alto livello di resistenza nei confronti di diversi antibiotici, ed in particolare verso i  $\beta$ -lattamici e i fluorochinoloni (Bottoni et al., 2015).

Non sorprende pertanto, che l'isolato *A. veronii* FES16(5) abbia dimostrato possedere dopo sequenziamento genomico i geni di resistenza *cphA4* e *ampS*.

CphA4 è una M $\beta$ L, quindi una  $\beta$ -lattamasi di classe B, appartenente al gruppo funzionale 3b. È specie-specifica, prevalentemente ritrovata in *A. hydrophila* e *A. veronii*, ma attiva solo su penemi e carbapenemi e non su penicilline e cefalosporine; solitamente è a localizzazione cromosomica ed

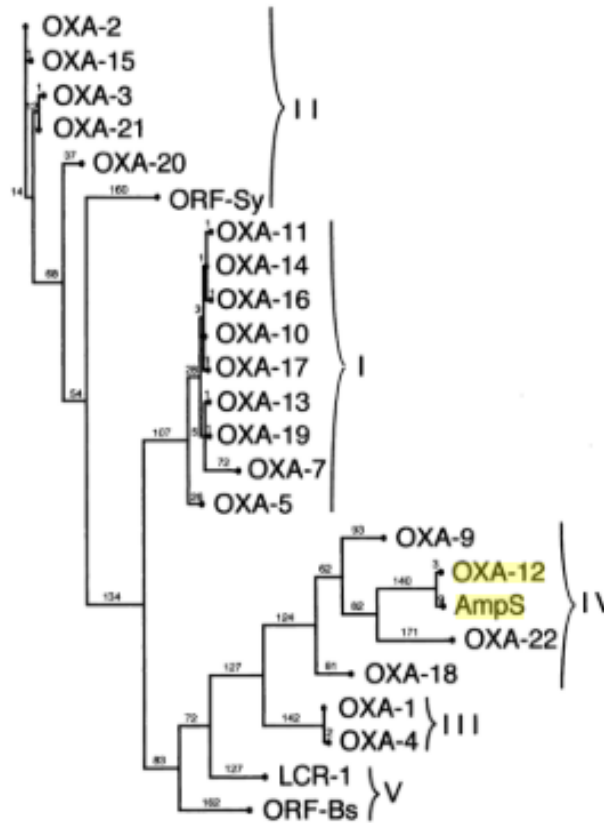
è inducibile (Bottoni et al., 2015). La localizzazione cromosomica di *cphA4* nel nostro ceppo *FES16(5)* era confermata dall'elevata similarità di sequenza del *contig* che portava tale gene con sequenze cromosomiche presenti nel database. Il confronto della sequenza aminoacidica di CphA4 del nostro ceppo con quelle presenti nel database indicavano la maggiore % di identità con l'enzima CphA4 identificato in un ceppo di *A. allosaccarophila*. Rispetto a questo tuttavia si osservavano 8 sostituzioni aminoacidiche che ricadevano nel sito catalitico dell'enzima, ma gli aminoacidi sostituiti erano simili dal punto di vista della polarità, tranne quelli alle estremità N-terminale e C-terminale. Possiamo quindi ipotizzare che sostituzioni di questo tipo, non comportino grandi cambiamenti dal punto di vista funzionale dell'enzima. È anche vero che CphA è la più comune MβL trovata in diverse specie di *Aeromonas* (Wu et al., 2012).

AmpS è una β-lattamasi di classe D, quindi una serina β-lattamasi (gruppo funzionale 2d), in grado di idrolizzare la penicillina ma non la cloxacillina ed l'oxacillina. Questo enzima è stato riscontrato in diverse specie del genere *Aeromonas*, come in *A. sobria*, già dalla fine degli anni '90 (Walsh et al., 1995).

Il gene che codifica per AmpS condivide spesso almeno il 96% della sequenza aminoacidica con *bla*<sub>OXA-12</sub>, una variante della famiglia delle OXA-

$\beta$ -lattamasi e in particolare appartenente al gruppo funzionale *2d* (Rasmussen et al., 1994). OXA-12, come AmpS, ha la caratteristica di essere inibito dall'acido clavulanico (Poirel et al., 2010); tuttavia (ed è ciò che lo contraddistingue da AmpS), possiede la capacità di inibire anche cloxacillina ed oxacillina. In letteratura è stato riportato, e ciò può essere riscontrato anche in GenBank, che AmpS corrisponde ad una  $\beta$ -lattamasi di classe D a localizzazione cromosomica in *A. hydrophila* (Rasmussen et al., 1994; Poirel et al., 2010).

La  $\beta$ -lattamasi AmpS, grazie alle sue caratteristiche di similarità con OXA-12, è inclusa nella grande famiglia dei geni OXA, e più precisamente nel *Gruppo IV*, come ci mostra anche l'albero filogenetico riportato di seguito (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Dendrogramma relativo alla famiglia degli enzimi OXA (Naas & Nordmann, 1999).

La correlazione filogenetica di AmpS e  $bla_{OXA-12}$  è stata infatti confermata dall'allineamento mostrato nei Risultati, in Figura 3.10, dove si osservava una sola sostituzione aminoacidica (residuo 264) nella struttura primaria di AmpS dell'isolato *A. veronii* FES16(5). Sebbene AmpS sia stato tipicamente descritto in *A. sobria*, l'allineamento della nostra proteina con la sequenza aminoacidica di AmpS presente in *A. sobria* indicava una differenza maggiore con quest'ultima piuttosto che con l'enzima OXA-12 (8 residui contro 1)

(Figura 3.10). Entrambi gli enzimi identificati in *A. veronii* FES16(5), cioè la MβL CphA4 e la β-lattamasi AmpS, sono responsabili in questo ceppo della resistenza intrinseca (o naturale) ai β-lattamici e in particolare ai carbapenemi imipenem e ertapenem. Tuttavia non essendo associati ad elementi plasmidici probabilmente la capacità del ceppo di trasferire mediante fenomeni di HGT questo tipo di resistenza rimane bassa e comunque da dimostrare.

Il ceppo *K. pneumoniae* 23999A2 isolato da molluschi, in seguito a sequenziamento genomico, ha mostrato invece di possedere ben 6 geni di resistenza, a dimostrazione del fatto che le CPE risultano essere spesso multiresistenti. Tra questi 6 geni, uno codificava la carbapenemasi di tipo KPC: *bla*<sub>KPC-3</sub>. La carbapenemasi KPC-3 assieme a KPC-2, è quella più frequentemente prodotta dai ceppi di *Klebsiella pneumoniae* (ma anche da altri CPB), sia in ambito ospedaliero che ambientale; se non che queste sono le due varianti di KPC anche più studiate, delle 24 varianti conosciute e diffuse in tutto il mondo (Paczosa & Mecsas, 2016; Rodrigues et al., 2016).

Il sequenziamento ci ha permesso di dedurre che la carbapenemasi KPC-3 era codificata da un plasmide appartenente al gruppo IncFIIK. In effetti anche in letteratura è frequentemente riportato il coinvolgimento dei plasmidi nella diffusione delle carbapenemasi di tipo KPC in *Klebsiella*. I plasmidi coinvolti possono essere IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR, IncN e ColE1 ma il replicon



IncFIIK è il predominante (Lee et al., 2016; Rodrigues et al., 2016). La presenza del gene *bla*<sub>KPC</sub> su plasmidi appartenenti a diversi gruppi di incompatibilità, ha favorito una sua rapida diffusione inter e intra-specifica, anche in diversi habitat, tra batteri CPE (Chen et al., 2014b). IncF/IncFII sono generalmente plasmidi coniugativi, pertanto successivi esperimenti di coniugazione in vitro saranno effettuati per dimostrare la trasferibilità del plasmide IncFIIK, e quindi della resistenza ai carbapenemi, da parte del ceppo *K. pneumoniae* 23999A2.

Tra i geni di resistenza ai  $\beta$ -lattamici il ceppo *K. pneumoniae* 23999A2 presentava inoltre *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1A</sub> e *bla*<sub>SHV-12</sub>. La  $\beta$ -lattamasi OXA-9 è un enzima che condivide tra il 45 ed il 54% della sequenza aminoacidica con gli enzimi OXA-12 e OXA-18, strettamente correlati ad esso. OXA-9 possiede la caratteristica peculiare tra gli enzimi OXA, di essere inibito da acido clavulanico e cloxacillina ma non da NaCl; è un enzima a spettro ristretto d'azione ed è localizzato prevalentemente su trasposoni (Poirel et al., 2010).

TEM-1A e SHV-12 sono delle ES $\beta$ L, quindi delle serina- $\beta$ -lattamasi (classe A), appartenenti al gruppo funzionale 2. SHV-12 sembra derivare dalla SHV-2a, che a sua volta si è diversificata da SHV-1. Le Es $\beta$ L di tipo SHV sono spesso associate a sequenze d'inserzione come la *IS26* (lunga 820 bp) che

media la loro mobilitazione sul cromosoma di *K. pneumoniae* (Kasap et al., 2010).

TEM-1A è invece un sottogruppo di TEM-1, quest'ultimo enzima identificato per la prima volta in un ceppo di *E. coli* nel '63 in Grecia (Bush, 2018). Le ESβL di tipo TEM risultano prevalentemente localizzate su trasposoni, come *Tn1*, *Tn2* e *Tn3* (Kasap et al., 2010).

Il sequenziamento di *K. pneumoniae* 23999A2 ha evidenziato che il nostro ceppo era un MDR, che portava diversi geni di resistenza e come *bla*<sub>KPC-3</sub>, anche *bla*<sub>TEM-1A</sub> e *bla*<sub>OXA-9</sub> associati tra loro (#contig 123) erano localizzati su uno dei plasmidi posseduti dal ceppo: ciò risulta di particolare importanza per il loro potenziale di trasferibilità e di diffusione. Non è la prima volta che questi due geni sono stati ritrovati sullo stesso plasmide, e proprio in *Klebsiella pneumoniae*: nel 2016 è stato descritto un ceppo clinico MDR di *K. pneumoniae* (U25), che presentava un plasmide (pMGRU25-002), con ben 20 geni di resistenza, tra cui *bla*<sub>TEM1A</sub> e *bla*<sub>OXA-9</sub>, come pure altri due geni codificanti β-lattamasi, cioè *bla*<sub>CTX-M-15</sub> e *bla*<sub>SHV-11</sub> (Rafiq et al., 2016).

Su 34 campioni di molluschi analizzati solo il ceppo di *K. pneumoniae* 23999A2 risultava produttore di carbapenemasi, indicando anche in questo caso che la categoria “molluschi”, perlomeno per quanto concerneva l'area di

campionamento di nostro interesse, non rappresenta un serbatoio di resistenza così importante.

La categoria di campioni che invece desta certamente più preoccupazione per la presenza di CPB è quella “acqua-sedimento-zooplacton”. Come già accennato nel Capitolo 3 sono stati identificati ben 14 ceppi batterici produttori di carbapenemasi su 21 ceppi resistenti, appartenenti alle specie *K. pneumoniae* (3), *A. veronii*, (8) di *S. algae*, (1), *P. stutzeri* (1) ed *E. coli* (1). La presenza di *A. veronii* è certamente predominante, rappresentando circa il 57% tra tutti gli isolati della categoria “acqua-sedimento-zooplacton”. Gli isolati di *A. veronii*, oltretutto, provenivano prevalentemente da zooplancton (6), mentre gli altri due sono stati riscontrati nei campioni di acqua. Lo zooplancton potrebbe quindi costituire un serbatoio di batteri resistenti e una fonte di infezione per i pesci planctofagi che attraverso la catena alimentare possono poi raggiungere l’uomo.

Studi passati hanno dimostrato, che spesso le acque costiere fungono da reservoir per microrganismi resistenti ai carbapenemi, (che tra l’altro sono spesso MDR e di particolare rilevanza clinica). Uno studio pubblicato nel 2014 rilevava la presenza di CPB, quali *Aeromonas* spp *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp. ed *Enterobacter* spp. nelle acque delle

spiagge turistiche a Rio de Janeiro, ed il gene maggiormente identificato risultava essere *bla*<sub>KPC-2</sub>, seguito da *bla*<sub>GES</sub>, e da altri geni di resistenza ai β-lattamici (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-9-like</sub>, *bla*<sub>SHV-like</sub>) (Montezzi et al., 2014). I determinanti di resistenza dei microrganismi possono trasferirsi dal contesto ospedaliero all'ambiente, poiché le acque di scarico degli ospedali ad esempio, mescolandosi a quelle urbane, vengono convogliate verso impianti per il trattamento delle acque reflue e poi rilasciati nell'ambiente; nell'ambiente acquatico possono sopravvivere, e quindi essere trasmessi all'uomo o agli animali (Yang et al., 2016). Riguardo ai 3 ceppi di *K. pneumoniae*, ritrovati in campioni di acqua e di zooplancton non abbiamo ancora informazioni riguardo ai geni di resistenza portati da questi ceppi, poiché le indagini molecolari per la ricerca delle 5 carbapenemasi più comuni non hanno prodotto risultati; sono in corso quindi ulteriori indagini per determinare la presenza di possibili varianti geniche codificanti per carbapenemasi. Altre analisi di PCR, come pure il sequenziamento, potrebbero rilevare la presenza di carbapenemasi meno diffuse, o altre β-lattamasi. Recentemente proprio nella specie *A. veronii* e *A. hydrophila*, in ceppi ambientali, sono state descritte due nuove varianti, CphA4 e CphA5, rispettivamente con attività idrolitica diversa rispetto al prototipo CphA descritto in *A. hydrophila* (Bottoni et al., 2015). Questo indica come

l'ambiente possa avere un ruolo importante nella evoluzione di nuove varianti di  $\beta$ -lattamasi che potrebbero rappresentare un problema per la salute umana visto che queste specie batteriche sono entrambe patogene per l'uomo e per gli animali.

La presenza di geni di resistenza associati a plasmidi, come pure l'alto numero di CPB riscontrati (soprattutto nella categoria "acqua-sedimento-zooplankton") sottolinea l'importanza dello sviluppo di sistemi di sorveglianza e di ricerca per valutare i meccanismi coinvolti nell'acquisizione e nella diffusione delle antibiotico-resistenze; e per determinare il rischio per la salute pubblica e determinare l'impatto relativo all'uso degli antibiotici in medicina umana e veterinaria.

## BIBLIOGRAFIA

**Abdallah** HM, Reuland EA, Wintermans BB, Al Naiemi N, Koek A, Abdelwahab AM et al. (2015). “Extended spectrum b-Lactamases and/or carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt”. PLoS ONE 10:e0136052 doi: 10.1371/journal.pone.0136052.

**Antonelli** G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. (2008). *Enterobacteriaceae*, Pagani L; *Aeromonas*, Pozzi G, Rossolini GM. In “Principi di microbiologia medica” 2008, A200-A219; A337-A342. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.

**Aslam** B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvil RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, Baloch Z. (2018). “Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis.” Infection and Drug Resistance, 2018:11 1645–1658.

**BIOLIFEITALIANA** – <http://www.biolifeit.com/>.

**BIOSIGMA** – <http://www.biosigma.it/>.

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool.  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

**Bonardi S, Pitino R, (2019).** “Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health”. *Italian Journal of Food Safety* 2019; 8:7956  
doi:10.4081/ijfs.2019.7956.

**Bottoni C, Marcoccia F, Compagnoni C, et al. (2015).** “Identification of New Natural CphA Metallo--Lactamases CphA4 and CphA5 in *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* Isolates from Municipal Sewage in Central Italy”. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4990–4993.  
doi:10.1128/AAC.00628-15.

**Bush K (2018).** “Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases”  
*Antimicrob Agents Chemother* 62:e01076-18.<https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.

**Canica M, Manageiro V, Jones-Dias D, Clemente L, Gomes-Neves E, Poeta P, et al. (2015).** “Current prospectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Res. Microbiol.* 166, 594-600. doi: 10.1016/j.resmic.2015.07.009.

**Centre for Genomic Epidemiology -**

<http://cge.cdu.dtu.dk/services/ResFinder>.

**Chen L**, Mathema B, Chavda KD, et al. (2014). “Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding”. Trends Microbiol. 22, 686–696. 10.1016/j.tim.2014.09.003.

**CLUSTAL OMEGA** – Multiple Sequence Alignment . EMBL-EBI.  
<http://ebi.ac.uk/>.

**Chromas** - <http://www.technelysium.com.au/chromas>.

**Croxen MA**, Finley BB. (2010). “Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity”. Nat Rev Microbiol. 2010 Jan;8(1):26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265.

**Davies K**, Davies J. (2010). “Origins and Evolution of Antibiotic Resistance”. Microbiology and molecular biology reviews, Sept. 2010, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.

**Demain AL**, Sanchez S. (2009). “Microbial drug discovery: 80 years of progress”. The Journal of Antibiotics (2009) 62, 5–16; doi:10.1038/ja.2008.16.



**Doi** Y, Paterson LD. (2015). “Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*.” *Seminars in respiratory and critical care medicine* 36.1: 74–84.

**ECDC** - European Centre for Disease Prevention and Control. <http://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/>.

**El Salabi** A, Walsh TR, Chouchani C. (2013). “Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria”. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013; 39(2): 113–122.

**EPICENTRO** - Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica - A cura dell'Istituto superiore di sanità. Antibiotico-resistenza. CPE: Rapporto N.1 - I dati 2018. <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/cpe-dati>.

**EUCAST** – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.

**EXPASY** – Bioinformatics Resource Portal. <http://web.expasy.org>.

**Fisher J, San José M, Roschanski N, Schmoger S, Baumann B, Irrgang A, et al. (2017).** “Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in three German swine farms in 2011 and 2012. *Veterinary Microbiology*. 200 (2017), 118-123. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.026.

**Grundmann H, Glasner C, et al. (2017).** “Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study”. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 153–63. Published Online November 17, 2016 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30257-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30257-2).

**Kasap M, Fashae K, Torol S, et al. (2010).** “Characterization of ESBL (SHV-12) producing clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* from a tertiary care hospital in Nigeria”. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010; 9: 1. doi: 10.1186/1476-0711-9-1.

**Köck R, Daniels-Hardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, Schwarz S, Jurke A. (2018).** “Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing and companion animals:

a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* 24 (2018) 1241-1250.

Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. (2016). “Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods”. *Front Microbiol*, 7 (2016), p. 895, 10.3389/fmicb.2016.00895. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1000. Published online 2016 Jun 28. doi: 10.3389/fmicb.2016.01000.

### **LIOFILCHEM**

[http://www.liofilchem.net/software/code\\_disk/code.php/](http://www.liofilchem.net/software/code_disk/code.php/).

Martinez JL. (2009). “The role of natural environments in the evolution of resistant traits in pathogenic bacteria” *Proc. R. Soc. B* (2009) 276, 2521–2530 doi:10.1098/rspb.2009.0320.

**MICROBEONLINE** - “MacConkey Agar (MAC): composition, preparation, uses and colony characteristics”.  
(<http://www.microbeonline.com>)

Milanović V, Osimani A, Roncolini A, Garofalo C, Aquilanti L, Pasquini M, Tavoletti S, Vignaroli C, Canonico L, Ciani M, Clementi F.

(2018). “Investigation of the dominant microbiota in ready-to-eat grasshoppers and mealworms and qualification of carbapenem resistance genes by qPCR”. *Microbiol.* 9:3036. doi: 10.3389/fmicb.2018.03036.

**Montezzi** LF, Campana EH, Correa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva IL, Souza Mdo C, Drolshagen M, Picao RC. (2015). “Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters”. *Int J Antimicrob Agents* 45:174–117. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016.

**Naas** T, Nordmann P. (1999). “OXA-type  $\beta$ -lactamases”. In *Current Pharmaceutical Design*, 1999, vol.5, 865-879.

**NCBI** – National Centre for Biotechnology Information.  
<http://ncbi.nlm.nih.gov/>.

**Oliveira** J, Reygaert WC. (2019). “Gram Negative Bacteria”. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Disponibile da: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>.

**Paczosa** MK, Meccas J. (2016). “Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense”. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:629–661. doi:10.1128/MMBR.00078-15.

**Pandey N, Cascella M. (2019).** “Beta Lactam Antibiotics”. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Disponible su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>.

**Pana D Z, Zaoutis T. (2018).** “Treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBLs) infections: what have we learned until now?” *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev):1347. doi:10.12688/f1000research.14822.1.

**Pishtiwan AH, Khadija KM. (2019).** “Prevalence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes among ES $\beta$ L-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq”. *Mediterr. J Hematol Infect Dis* 2019, 11(1): e2019041, doi: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2019.041>.

**Poirel L, Naas T, Nordmann P. (2010).** “Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases”. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Jan. 2010, 24–38. doi:10.1128/AAC.01512-08.

**Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. (2011).** “Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes”. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119-23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.

**Poirel** L, Potron A, Nordmann P. (2012). “OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace”. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1597–1606. doi:10.1093/jac/dks121.

**Queenan** AM, Bush K. (2007). “Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases”. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2007, p. 440–458. doi:10.1128/CMR.00001-07.

**Rafiq** Z, Sam N, Vaidyanathan R. (2016). “Whole genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate from India”. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 111(2): 144-146, February 2016.

**Rodrigues** C, Bavlovič J, Machado E, et al. (2016). “KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal Linked to Previously Circulating Non-CG258 Lineages and Uncommon Genetic Platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN)”. *Front. Microbiol.*, 28 June 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01000>.

**Scotta** C, Juan C, Cabot G, Oliver A, Lalucat J, Bennisar A, Albertí S. (2011). “Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamases”. *Antimicrob*

Agents Chemother. 2011 Nov;55(11):5376-9. doi: 10.1128/AAC.00716-11.

**Tängdén** T, Giske CG. (2015). “Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control”. J Intern Med 2015; 277: 501 –512. doi: 10.1111/joim.12342.

**Tzouvelekis** LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. (2012). “Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions”. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct;25(4):682-707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.

**Webb** HE, Bugarel M, den Bakker HC, Nightingale KK, Granier SA, Scott HM, Loneragan GH. (2016). “Carbapenem-Resistant Bacteria Recovered from Faeces of Dairy Cattle in the High Plains Region of the USA.” PLoS One. 2016 Jan 29;11(1):e0147363. doi: 10.1371/journal.pone.0147363.

**Woodford** N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. (2014). “Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging

public health risk of our own making?” J Antimicrob Chemother. 2014 Feb;69(2):287-91. doi: 10.1093/jac/dkt392.

**Wu** CJ, Chen PL, Wu JJ, et al. (2012). “Distribution and phenotypic and genotypic detection of a metallo- $\beta$ -lactamase, CphA, among bacteraemic *Aeromonas* isolates”. Journal of Medical Microbiology (2012), 61, 712–719 DOI 10.1099/jmm.0.038323-0.

**Yang** F, Mao D, Zhou H, Luo Y. (2016) “Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China”. PLoS ONE 11(5):e0156383.doi:10.1371/journal.

**Zurfluh** K, Poirel L, Nordmann P, Klumpp J, Stephan R. (2015). “First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland”. Antimicrob Resist Infect Control 4, 38 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0080-5>.

**Zurfluh** K, Hindermann D, Nüesch-Inderbinen M, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. (2016). “Occurrence and features of chromosomally encoded carbapenemases in Gram-negative bacteria in farm animals sampled at slaughterhouse level”. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 158(4):457-460. DOI: <https://doi.org/10.17236/sat00072>.