



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

**Corso di Laurea Magistrale**

**Biologia Molecolare ed Applicata curriculum tecnologie biologiche**

**PREVALENZA E CARATTERIZZAZIONE DI *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE* RESISTENTE AI CARBAPENEMI DA  
CAMPIONI FECALI**

**“Prevalence and characterization of carbapenem-resistant  
*Klebsiella pneumoniae* strains recovered from fecal samples”**

*Tesi di Laurea Magistrale di:*

**Federica Tontarelli**

*Relatore:*

**Prof.ssa Marina Mingoia**

*Correlatore:*

**Dott.ssa Gloria Magi**

*Anno accademico 2018-2019*



## *Sommario*

Indice delle Tabelle .....	4
Indice delle Figure .....	5
1. INTRODUZIONE .....	7
1.1 Generalità e classificazione delle $\beta$ -lattamasi.....	9
1.2 Caratteri distintivi di <i>K. pneumoniae</i> .....	12
1.3 Scopo della tesi.....	18
2. MATERIALI E METODI .....	19
2.1 Principali terreni di coltura utilizzati .....	19
2.2 Protocollo di screening per isolamento e identificazione di CPE .....	22
2.3 Determinazione del profilo di sensibilità/resistenza agli antibiotici .....	24
2.4 Determinazione della capacità di produrre ESBL e carbapenemasi.....	27
2.5 Analisi genotipica .....	30
2.6 Tipizzazione.....	37
2.7 Analisi plasmidica .....	41
2.8 Prove di trasferimento interspecifico di plasmidi contenenti il gene bla <sub>KPC</sub> .....	42
2.9 Analisi molecolare dei plasmidi presenti in ceppi di <i>K. pneumoniae</i> KPC+ .....	43
3. RISULTATI.....	45
3.1 Determinazione del profilo di sensibilità/resistenza agli antibiotici .....	45
3.2 Determinazione della capacità di produrre ESBL e carbapenemasi.....	47
3.3 Analisi genotipica .....	47
3.4 Tipizzazione.....	49
3.5 Analisi plasmidica .....	52
3.6 Prove di trasferimento interspecifico di plasmidi contenenti il gene bla <sub>KPC</sub> .....	53
3.7 Analisi molecolare dei plasmidi presenti in ceppi di <i>K. pneumoniae</i> KPC+ .....	54

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	56
5. BIBLIOGRAFIA .....	60

## Indice delle Tabelle

Tabella 1 Interpretazione dei risultati.....	21
Tabella 2 Interpretazione dei risultati.....	22
Tabella 3 Breakpoint di riferimento dei diametri di inibizione per l'ordine Enterobacterales. .....	25
Tabella 4 mCIM. Interpretazione dei risultati.....	30
Tabella 5 Caratteri distintivi delle coppie di primers impiegate nella Multiplex PCR. ....	34
Tabella 6 Composizione della mix con volume finale di 50 µL.....	34
Tabella 7 Programma di amplificazione.....	34
Tabella 8 Caratteristiche distintive delle coppie di primers impiegate nella Multiplex PCR. .....	35
Tabella 9 Composizione della mix con volume finale di 50 µL.....	35
Tabella 10 Programma di amplificazione della Multiplex PCR.....	36
Tabella 11 Composizione relativa della soluzione di digestione. ....	39
Tabella 12 Condizioni di corsa della PFGE per <i>K. pneumoniae</i> .....	39
Tabella 13 Criteri di interpretazione dei pattern di PFGE.....	40
Tabella 14 Caratteristiche distintive delle coppie di primers impiegate nella MLST PCR. 40	
Tabella 15 Programma di amplificazione della PCR. ....	41
Tabella 16 Composizione relativa della soluzione di digestione. ....	42
Tabella 17 Condizioni di corsa della PFGE per <i>K. pneumoniae</i> .....	42
Tabella 18 Mix di reazione.....	44
Tabella 19 Profilo di sensibilità/resistenza dei ceppi di <i>Klebsiella</i> spp. e relativa classificazione.....	46
Tabella 20 Risultati della PCR per la ricerca di geni codificanti le β-lattamasi.....	48
Tabella 21 Risultati della PCR per la ricerca di geni codificanti e β-lattamasi.....	49
Tabella 22 Tipizzazione dei 20 ceppi di <i>K. pneumoniae</i> mediante XbaI-PFGE ed interpretazione dei pulsotipi utilizzando criteri di letteratura (Tenover et al., 1995).....	50
Tabella 23 Profilo allelico dei ceppi produttori di carbapenemasi.....	51
Tabella 24 Interpretazione della S1-PFGE.....	52
Tabella 25 Risultati delle prove di coniugazione. ....	53
Tabella 26 Profilo di sensibilità/resistenza alle varie classi di antibiotici.....	53
Tabella 27 Risultati del PBRT 2.0 kit.....	55

## Indice delle Figure

Figura 1 Morti annuali attribuite ad AMR comparate con le altre principali cause di mortalità. ....	7
Figura 2 <i>K. pneumoniae</i> on SEM. ....	13
Figura 3 Principali caratteri strutturali dei plasmidi pKpQIL-IT, pKPN-IT, pIncX-SHV e ColEST258 tipici dei cloni con ST258 e relativo confronto con i plasmidi di riferimento. 15	
Figura 4 Principali STs presenti in Italia e relativa distribuzione geografica. ....	16
Figura 5 Principali caratteri strutturali dei plasmidi tipici dei cloni con ST307. ....	17
Figura 6 MacConckey Agar. Aspetto e colorazione di colonie lattosio-fermentanti e lattosio-non fermentanti. ....	19
Figura 7 Chromatic CRE Agar. Aspetto e colorazione di varie specie microbiche. ....	21
Figura 8 Brilliance CRE Agar. Aspetto e colorazione tipica di <i>E. coli</i> , gruppo KESC. ....	21
Figura 9 Galleria API 20 E dopo incubazione. In alto le reazioni sono tutte negative, in basso sono tutte positive. ....	23
Figura 10 Galleria API 20 NE dopo incubazione. In alto le reazioni sono tutte negative, in basso sono tutte positive. ....	23
Figura 11 Possibile risultato di una galleria API 20E. ....	23
Figura 12 Comparsa di un alone di inibizione dopo incubazione overnight a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . 24	
Figura 13 Antibiogramma. Disposizione schematica dei dischetti di antibiotico nelle piastre di MHA. ....	26
Figura 14 MIC in agar a sinistra, MIC in brodo a destra. ....	27
Figura 15 E-test relativo a 5 differenti antibiotici. ....	27
Figura 16 DDST. A sinistra il risultato tipico di un ceppo produttore di ESBL, a destra il risultato tipico di un ceppo non produttore di ESBL. ....	28
Figura 17 MHT e relativi risultati. ....	29
Figura 18 mCIM e relativi risultati. ....	30
Figura 19 Reazione ciclica della PCR. ....	33
Figura 20 Migrazione differenziale dei frammenti di DNA da catodo ad anodo in presenza di un campo elettrico. ....	36
Figura 21 Possibile risultato della corsa elettroforetica al transilluminatore. ....	37
Figura 22 Mix di PCR con i relativi repliconi e risultato rappresentativo della corsa elettroforetica derivante dalle multiplex PCR con i soli controlli positivi. ....	44

Figura 23 Programma di amplificazione della PBRT. ....	44
Figura 24 Composizione relativa dei ceppi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae positivi allo screening. ....	45
Figura 25 Analisi XbaI-PFGE mediante il software BioNumerics 7.0 (Applied Maths Scientific Software Development, Sint-Martens-Latem, Belgium). Analisi di cluster e costruzione del dendrogramma mediante UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). ....	51

## 1. INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica (AMR) è un fenomeno inevitabile dal punto di vista evolutivo in quanto rappresenta il naturale meccanismo tramite cui i microrganismi sono in grado di vincere la pressione selettiva derivante dal necessario utilizzo di antibiotici. Ad oggi la resistenza agli agenti antimicrobici costituisce una delle più gravi minacce per la salute pubblica a causa del suo forte impatto a livello epidemiologico ed economico. A tal proposito, stando a quanto emerge dai dati del report O'Neill, se il fenomeno non verrà in qualche modo arginato e manterrà il trend attuale, si stima che nel 2050 si renderà responsabile della morte di 10 milioni di individui annui e di una riduzione del 2-3,5% nel prodotto interno lordo (PIL), con un costo complessivo di 100 trilioni di dollari (O' Neill, 2016).

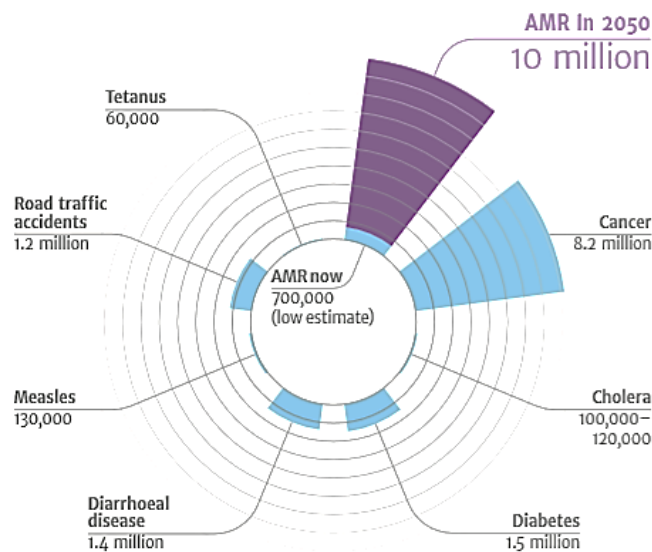


Figura 1 Morti annuali attribuite ad AMR comparate con le altre principali cause di mortalità.

Recentemente la World Health Organization (WHO), un ente con il compito di stilare la lista di priorità dei batteri antibiotico-resistenti a livello globale, ha individuato 3 diversi livelli di priorità ed ha collocato le *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi nel livello di priorità più alto, anche noto come “livello critico”, insieme ad *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, entrambi resistenti ai carbapenemi (WHO, 2017). Il motivo principale di tale scelta risiede nel fatto che i carbapenemi rappresentano la risorsa terapeutica di ultima linea per il trattamento delle infezioni sostenute da batteri Gram-negativi multi-resistenti (MDR o Multi-Drug Resistant); di conseguenza, la loro perdita di efficacia comporta inevitabilmente un forte incremento di morbosità e mortalità.



A seconda del particolare meccanismo tramite cui acquisiscono la resistenza ai carbapenemi, le *Enterobacteriaceae* si possono distinguere in ceppi resistenti ai carbapenemi (CRE) ed in ceppi produttori di carbapenemasi (CPE). Nel primo caso i meccanismi alla base della resistenza sono vari, spesso associati tra loro e in genere derivanti da mutazioni adattative di geni cromosomici: iperproduzione di  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC (cefalosporinasi); produzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL); perdita o modificazione delle porine con conseguente riduzione della permeabilità della loro membrana esterna; iper-espressione di pompe di efflusso. Nel secondo caso, invece, il meccanismo alla base della resistenza riguarda essenzialmente la produzione di carbapenemasi, ossia particolari enzimi capaci di idrolizzare i carbapenemi e, dato che i geni corrispondenti solitamente si trovano su plasmidi coniugativi e possono dunque essere trasferiti ad altre specie batteriche per trasferimento genico orizzontale, la loro presenza rappresenta una seria minaccia per le reti sanitarie locali e nazionali in quanto anche i protocolli sanitari più moderni potrebbero essere facilmente compromessi dalla rapida e preoccupante diffusione di questi ceppi.

Le carbapenemasi sono molto variabili tra loro per tipo e spettro d'attività antimicrobica, ma complessivamente conferiscono resistenza o non sensibilità a tutti o quasi tutti i  $\beta$ -lattamici; inoltre, la maggior parte dei ceppi CPE risulta fenotipicamente MDR (Multi-Drug Resistant), XDR (eXtensively Drug-Resistant) o PDR (Pan Drug Resistant). In particolare, per ceppi MDR si intendono tutti i batteri resistenti o non suscettibili ad almeno un antibiotico in 3 classi antimicrobiche differenti; per ceppi XDR si intendono tutti i batteri resistenti o non suscettibili ad almeno un antibiotico in tutte le classi antimicrobiche, eccetto 1-2 di esse e per ceppi PDR si intendono tutti i batteri resistenti o non suscettibili al pannello completo di antibiotici testati di routine (Magiorakos et al., 2012). Conseguentemente è fondamentale riuscire a comprendere la loro distribuzione geografica e ad individuarne i serbatoi non solo nella popolazione umana, ma anche nei settori agricoli, nelle industrie e negli allevamenti per poi adottare le giuste misure preventive al fine di limitare il più possibile la loro diffusione.

Al momento il nostro Paese, insieme ad USA, Israele e Grecia, costituisce il principale serbatoio di *K. pneumoniae* produttrice di KPC e proprio per questo motivo la ricerca e la caratterizzazione dei ceppi in questione assume una enorme rilevanza nelle suddette aree geografiche.

Per di più, in Italia la situazione risulta particolarmente preoccupante in quanto a partire dal 2010 si è verificata una rapida ed allarmante diffusione di ceppi CPE, la maggior parte dei quali coincide con ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC (Giani et al., 2013).

### ***1.1 Generalità e classificazione delle $\beta$ -lattamasi***

Le  $\beta$ -lattamasi sono enzimi di origine batterica, molto versatili ed in grado di assumere un numero limitato di strutture molecolari, che risultano accomunati dalla capacità di idrolizzare dei composti chimici contenenti un anello  $\beta$ -lattamico al proprio interno, tra cui principalmente i  $\beta$ -lattamici, ossia particolari antibiotici che intervengono nella fase finale di sintesi del peptidoglicano, anche nota come fase di transpeptidazione, impedendo la formazione di ponti crociati tra i polimeri, con conseguente morte cellulare.

Dal punto di vista biochimico, le  $\beta$ -lattamasi si suddividono in 2 categorie principali in funzione del particolare meccanismo con cui espletano la propria azione idrolitica: alcuni sfruttano un residuo di serina presente nel sito attivo; mentre altri si servono di uno o più ioni zinco come cofattori. Un altro criterio di classificazione individua 4 gruppi differenti in base al particolare substrato idrolizzato: ...); le carbapenemasi agiscono sui carbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem, ...); le penicillinasi sulle penicilline (penicillina, amoxicillina, ampicillina, le monobattamasi sui monobattami (aztreonam, ...) e ancora le cefalosporinasi sulle cefalosporine (cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ...) (Bush et al., 2018). Ad oggi la classificazione più utilizzata è quella di Ambler, la quale individua 4 classi principali (A–D) in base alle dimensioni molecolari e al grado di omologia dei motivi amminoacidici del sito attivo (Ambler et al., 1980). La *classe A* comprende numerose  $\beta$ -lattamasi attive nei confronti di una grande varietà di substrati, quali penicilline, monobattami, carbapenemi e cefalosporine e sono tutte accomunate dalla presenza di un residuo di serina a livello del sito attivo. Gli enzimi principali inclusi nella classe A comprendono essenzialmente KPC in qualità di carbapenemasi e CTX-M come ESBL:

- **KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi).** Attualmente le KPC sono gli enzimi di gran lunga più significativi dal punto di vista clinico in quanto si trovano prevalentemente in *K. pneumoniae*, che è un patogeno nosocomiale di grande rilievo, e conferiscono alti livelli di resistenza non solo ai carbapenemi, ma anche a molti altri  $\beta$ -lattamici, incluse le cefalosporine a spettro esteso.

In particolare, il gene *bla<sub>KPC</sub>* è stato identificato per la prima volta in un isolato di *K. pneumoniae* sulla costa orientale degli USA nel 1996 e da allora i produttori di KPC si sono rapidamente diffusi a livello mondiale, diventando endemici in USA, Israele, Grecia e Italia. Ad oggi esistono ben 19 varianti alleliche di KPC che si trovano prevalentemente in *K. pneumoniae*, sebbene siano state riscontrate in percentuale minore anche in altri batteri Gram-negativi e quelle in assoluto più frequenti sono KPC-2, che è la variante allelica più antica e KPC-3 ed in Italia si rilevano entrambe (Nordmann et al., 2014).

- **TEM.** Le varianti alleliche TEM-1 e TEM-2 sono le prime ad essere state scoperte e nello specifico il gene *bla<sub>TEM-1</sub>* è stato identificato per la prima volta in un isolato di *E. coli* in Grecia nel 1965; tuttavia, costituiscono entrambe delle  $\beta$ -lattamasi a spettro ridotto in quanto sono in grado di agire solo su penicilline e cefalosporine di I generazione. Le altre varianti alleliche, invece, sono delle vere e proprie ESBLs poiché riescono ad idrolizzare anche monobattami e cefalosporine di III e IV generazione. A tal riguardo, numerosi studi hanno dimostrato che il cambiamento del loro spettro di attività è il risultato della sostituzione di alcuni residui amminoacidici in corrispondenza del sito attivo (Bush et al., 2018).
- **SHV.** La variante allelica SHV-1 è la prima ad essere stata scoperta e il gene *bla<sub>SHV-1</sub>* è stato identificato per la prima volta in un ceppo di *E. coli* nel 1970; tuttavia, tale variante corrisponde ad una  $\beta$ -lattamasi a spettro ridotto poiché è in grado di agire esclusivamente su penicilline e cefalosporine di I generazione. Tutte le altre varianti alleliche, invece, sono delle vere e proprie ESBLs poiché riescono ad idrolizzare anche monobattami e cefalosporine di III e IV generazione. Come già osservato per TEM, anche per tali enzimi l'aumento dello spettro di attività è la conseguenza di modificazioni amminoacidiche associate con l'alterazione della configurazione molecolare in corrispondenza del loro sito attivo (Bush et al., 2018).
- **CTX-M.** Le CTX-M sono diffuse in tutto il mondo e rappresentano il gruppo di ESBL più rilevante dal punto di vista clinico poiché, a differenza di TEM e SHV, sono tutte delle ESBLs. Dal punto di vista filogenetico, questi enzimi sono strettamente correlati alle  $\beta$ -lattamasi cromosomiche proprie del genere *Kluyvera*, sebbene tale specie sia raramente associata a manifestazioni cliniche.

Delle numerose varianti alleliche descritte, ciascuna delle quali dotata di una diversa distribuzione geografica, le più comuni sono certamente CTX-M-14 e CTX-M-15 (Bush et al., 2018).

La classe B è costituita da metallo- $\beta$ -lattamasi (MBLs), ovvero enzimi che necessitano di uno o più ioni zinco per espletare correttamente la loro azione e che presentano uno spettro di idrolisi simile agli antibiotici di classe A (fatta eccezione per i monobattami). Gli enzimi principali inclusi nella classe B comprendono IMP, VIM e la più recente NDM.

- **IMP (Imipenase).** Le IMP sono le prime MBLs ad essere state identificate in molti bacilli Gram-negativi di grande rilievo clinico ed il loro nome deriva dal fatto che sono attive solo su imipenem, cefalosporine e penicilline. Il gene *bla*<sub>IMP</sub> è stato identificato per la prima volta in *Serratia marcescens* in Giappone nel 1991 e da allora i produttori di IMP si sono diffusi a livello globale, sebbene per lo più in maniera sporadica, fatta eccezione per Giappone, Taiwan e Cina orientale (Nordmann et al., 2014).
- **VIM (Verona integron-encoded MBLs).** Il gene *bla*<sub>VIM</sub> è stato identificato dapprima in Italia e più precisamente a Verona (VIM-1) e poi in Francia (VIM-2) e da allora i produttori di VIM si sono diffusi a livello mondiale, diventando endemici in Italia, Spagna e Grecia, nonché in Corea del Sud e in Taiwan. Ad oggi esistono ben 41 varianti alleliche di VIM, le quali si trovano prevalentemente in *P. aeruginosa*, sebbene siano state riscontrate in percentuale minore anche in altri batteri Gram-negativi, compresi *K. pneumoniae* ed *E. coli* (Nordmann et al., 2014).
- **NDM (New Delhi MBLs).** Le NDM fanno parte degli enzimi più significativi dal punto di vista clinico e condividono un basso grado di somiglianza con le altre MBLs (da qui il nome di nuova metallo- $\beta$ -lattamasi). Il gene *bla*<sub>NDM</sub> è stato identificato per la prima volta in *K. pneumoniae* e successivamente in *Escherichia coli*, entrambi isolati dallo stesso paziente svedese ricoverato in India nel 2009. Dalla data del primo isolamento i ceppi produttori di NDM si sono rapidamente diffusi a livello globale, diventando endemici in India, Pakistan e Bangladesh. Ad oggi esistono circa 10 varianti alleliche di NDM, la più frequente delle quali è NDM-1.

La classe C consta di  $\beta$ -lattamasi attive essenzialmente sulle cefalosporine ed i suoi principali rappresentanti sono AmpC e CMY.

- **AmpC.** Le AmpC sono cefalosporinasi a codificazione cromosomica e rappresentano le prime  $\beta$ -lattamasi ad essere state rilevate nei batteri Gram-negativi, di fatti il gene *bla*<sub>AmpC</sub> è stato identificato per la prima volta in *Bacillus coli* nel 1940 (Bush et al., 2018).
- **CMY.** Le CMY corrispondono ad AmpC a codificazione plasmidica e sono emerse solo in un secondo momento, di fatti il gene *bla*<sub>CMY</sub> è stato per identificato per la prima volta nel 1990 e ad oggi non è ancora noto il meccanismo tramite cui è avvenuto il suo trasferimento su un supporto plasmidico (Bush et al., 2018).

La classe D è formata da OXA-  $\beta$ -lattamasi o oxacillinasi, ossia enzimi in grado di idrolizzare efficacemente le isossazolil-penicilline ed attivi su penicilline e cefalosporine, i cui principali rappresentanti sono OXA-48 e OXA-23.

- **OXA-48 (oxacillinasi-48).** Le OXA-48 sono il principale gruppo di oxacillinasi ad oggi note e, rispetto agli enzimi di classe A, B e C, presentano una ridotta attività carbapenemasi. Il gene *bla*<sub>OXA-48</sub> è stato identificato per la prima volta in *K. pneumoniae* in Turchia nel 2003 e da allora i produttori di OXA-48 si sono diffusi a livello globale, diventando endemici in Nord Africa e Turchia e manifestandosi solo sporadicamente in alcuni Paesi europei, quali Spagna e Francia (Nordmann et al., 2014).

## 1.2 Caratteri distintivi di *K. pneumoniae*

*K. pneumoniae* è un batterio Gram-negativo della famiglia delle *Enterobacteriaceae* che è stato descritto per la prima volta da Carl Friedlaender nel 1882 in seguito al suo isolamento dai polmoni di alcuni pazienti morti di polmonite (Friedlaender, 1882). Tutti i membri del genere *Klebsiella* sono accomunati da una forma bastoncellare e dalla co-espressione di 2 differenti tipi di antigeni in corrispondenza della loro membrana esterna, i quali sono denominati lipopolisaccaride O e polisaccaride capsulare o anche antigene K e risultano entrambi implicati nella patogenicità. Nello specifico, tali antigeni promuovono la loro adesione alle cellule ospiti, ne impediscono la fagocitosi da parte di granulociti polimorfonucleati, prevengono la fissazione del complemento e conferiscono una buona resistenza ai molteplici meccanismi di difesa dei possibili ospiti.



Figura 2 *K. pneumoniae* on SEM.

La loro distribuzione è ubiquitaria in natura, difatti oltre ad essere commensali negli uomini a livello di orofaringe, rinofaringe e tratto gastro-intestinale, tali microrganismi si ritrovano anche in animali, piante, suolo ed acqua (Martin et al., 2018).

*K. pneumoniae* rappresenta senza dubbio la specie clinicamente più rilevante ed è un patogeno opportunisto associato con gravi infezioni in pazienti ospedalizzati (soprattutto se ricoverati nelle unità di terapia intensiva e/o sottoposti ad un uso prolungato di catetere urinario o endovenoso o di dispositivi per la ventilazione assistita), fortemente immunocompromessi o affetti da gravi patologie croniche, tra cui il diabete (Podschun et al., 1998). A tal proposito, vari studi hanno dimostrato che tale microrganismo costituisce la terza principale causa di infezioni nosocomiali negli USA, dove si rende responsabile di polmoniti, infezioni del tratto urinario (UTIs), sepsi e meningiti (Magill et al., 2014).

Le infezioni nosocomiali sostenute da *K. pneumoniae* sono un importante problema medico-sanitario a livello globale e di recente la situazione si è aggravata a causa della comparsa di un'ampia varietà di ceppi multi-resistenti che rendono sempre più inefficaci le opzioni terapeutiche disponibili, portando dunque ad un inevitabile incremento nella loro incidenza e ad un aumento della morbosità e della mortalità.

I primi ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi erano caratterizzati da una perdita o una modifica delle porine OmpK35 e OmpK36, spesso in associazione con l'iperproduzione di AmpC cromosomica o di ESBLs. La successiva emergenza di carbapenemasi, prevalentemente a codificazione plasmidica, ha portato ad una rapida diffusione di ceppi multi-resistenti a livello globale, soprattutto nel caso in cui i geni codificanti carbapenemasi ed ESBLs risultino veicolati da plasmidi coniugativi ad ampio spettro d'ospite (García-Fernández et al., 2012).

A tal proposito, i centri per la prevenzione e il controllo delle malattie statunitensi (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) hanno riscontrato un forte aumento di CPE soprattutto negli ultimi anni e relativamente alla specie *K. pneumoniae* (da 1,6% del 2001 a 10,4% del 2011). Nel 2012, inoltre, il centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC) ha lanciato il progetto "European Survey on the Enterobacteriaceae Producing Carbapenamas" (EuSCAPE) al fine di determinare statisticamente incidenza ed epidemiologia degli isolati di *K. pneumoniae* non suscettibili ai carbapenemi su scala continentale (Giani et al., 2013).

Per la sua realizzazione sono stati presi in considerazione ben 2301 campioni di *K. pneumoniae* e 402 campioni di *E. coli* raccolti in 36 Paesi europei tra il 2013 e il 2014 ed i risultati ottenuti hanno evidenziato che il 71% dei ceppi era produttore di carbapenemasi, soprattutto KPC (45%) e OXA-48 (37%) e solo in minor misura NDM (11%) e VIM (8%) (Grundmann et al., 2016). Un altro dato molto interessante emerso da questo studio di sorveglianza ha riguardato la netta prevalenza di *K. pneumoniae* su *E. coli* (11:1) e, nell'ambito di tale specie, la ragguardevole preponderanza dei ceppi produttori di KPC (96%) rispetto ai ceppi produttori di altri determinanti di resistenza (VIM 1,5%; OXA-48 0,5% e NDM 0,5%, nessuna delle principali carbapenemasi 1,5%).

Il problema della diffusione di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC è particolarmente sentito in Italia, dove a partire dal 2009 si è andata sviluppando una vera e propria epidemia di alcuni cloni epidemici, la maggior parte dei quali appartiene al complesso clonale 258 (CC258), che include molti *sequence type* differenti, tra cui in particolare il clone originario ST258 come clone prevalente a livello mondiale e ST512 come clone prevalente in Italia, il quale differisce dal ST258 per una variazione a singolo locus genico (Mathers et al., 2015). Una recente analisi filogenetica dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) a livello del core genomico di vari ceppi di *K. pneumoniae* ST258 ha dimostrato la loro appartenenza a 2 linee genetiche evolutive ben definite e note come clade I e clade II, i quali differiscono tra loro per una regione di 215 Kb che ospita al suo interno il gene responsabile della biosintesi della capsula polisaccaridica (*cps*). I 2 cladi presentano dei pathways evolutivi diversi: nello specifico, gli isolati appartenenti al clade I presentano la variante allelica KPC-2; mentre gli isolati che fanno parte del clade II possiedono la KPC-3.

In generale, negli isolati con ST258 sono stati individuati numerosi tipi di plasmidi contenenti *bla*<sub>KPC</sub>, i quali appartengono a gruppi di incompatibilità diversi e sono quasi tutti a ristretto spettro d'ospite (IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncN, IncR e ColE1), fatta eccezione per IncA/C e IncN. Il plasmide più frequentemente identificato è classificato nel gruppo IncFII<sub>k</sub> ed è stato descritto in ceppi KPC-produttori in molteplici aree geografiche anche molto distanti tra loro, tra cui Canada, Polonia, USA, Israele, Italia, Grecia e Norvegia (Mathers et al., 2015). Una recente analisi del resistoma e del mobiloma di *K. pneumoniae* ST258 KPC-produttore ha evidenziato che sono in circolazione 2 sottogruppi dei plasmidi di gruppo IncFII<sub>k</sub>, pKPN-IT e pKpQIL-IT, i quali presentano omologia rispettivamente con i plasmidi pKPN3 (USA) e pKpQIL (Israele). Altri plasmidi individuati sono pIncX-SHV, che appartiene al gruppo IncX e contiene il gene *bla*<sub>SHV</sub>, e ColEST258 (gruppo ColE1), che ospita *aac*(6')-Ib come parte del trasposone Tn1331. A tal proposito, un aspetto di grande rilievo riguarda la perfetta identità (100% di query coverage e 100% di identità nucleotidica) tra i plasmidi ColEST258 e 15S (USA), il quale contiene il trasposone Tn4401 con al suo interno il gene *bla*<sub>KPC-2</sub> (Garcia-Fernandez et al., 2012).

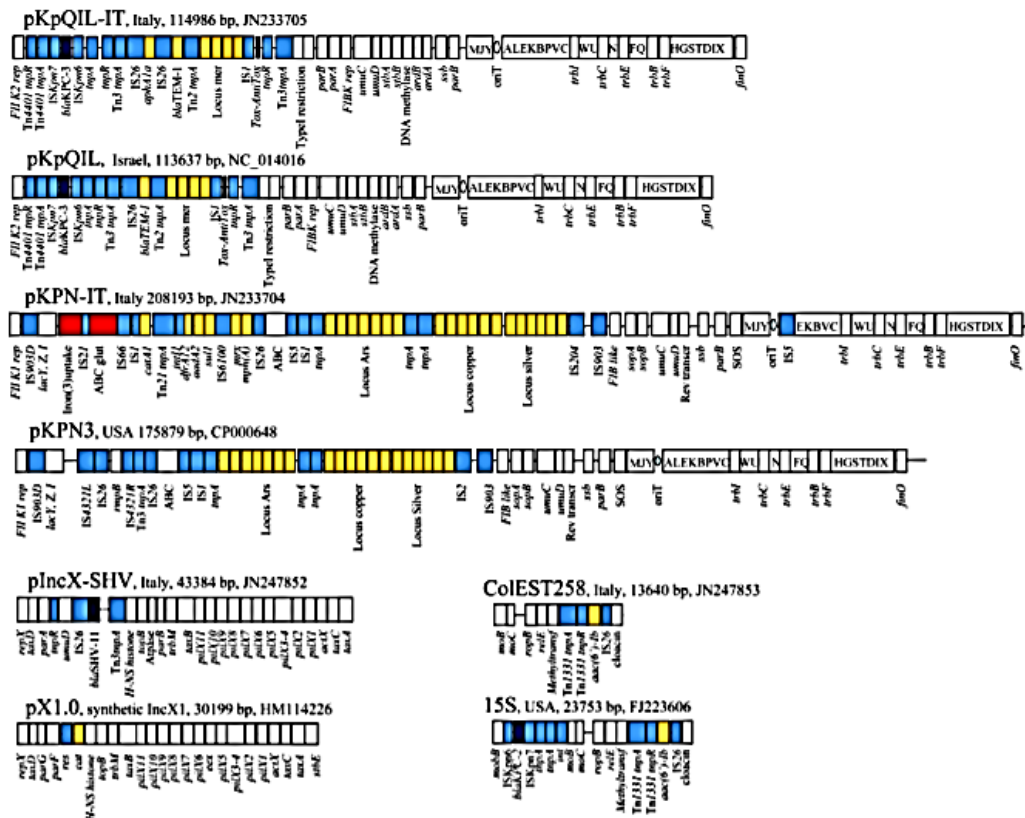


Figura 3 Principali caratteri strutturali dei plasmidi pKpQIL-IT, pKPN-IT, pIncX-SHV e ColEST258 tipici dei cloni con ST258 e relativo confronto con i plasmidi di riferimento.



Un recente studio promosso dall'Istituto Superiore di Sanità per mettere in luce i meccanismi di resistenza ai carbapenemi e le relazioni clonali esistenti tra i ceppi CPE di *K. pneumoniae* isolati dai principali ospedali italiani ha evidenziato la presenza di 9 STs differenti (ST258, ST512, ST1879, ST1633, ST101, ST15, ST307, ST45 e ST2032), di cui ST258, ST512 e ST1879 appartenenti al CC258. In realtà, la maggior parte degli isolati (94%) appartiene al CC258, che difatti presenta una distribuzione geografica parecchio estesa; mentre gli altri STs compaiono solo sporadicamente e presentano al momento una distribuzione geografica più limitata (Conte et al., 2016).

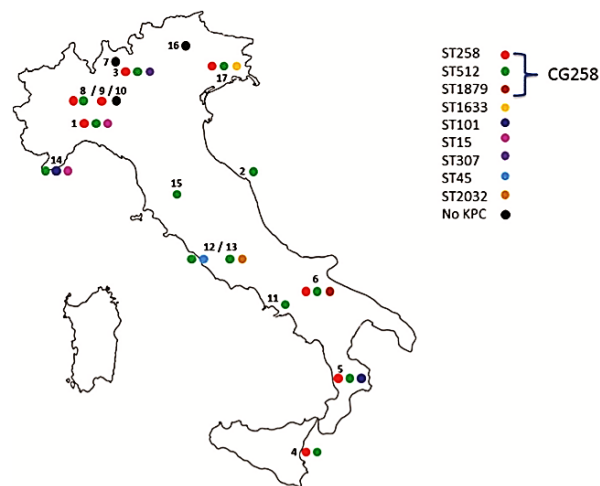


Figura 4 Principali STs presenti in Italia e relativa distribuzione geografica.

A livello internazionale, i cloni con ST307 sono candidati a diventare uno dei più rilevanti dal punto di vista clinico poiché la loro presenza è stata registrata in vari Paesi del Mondo nel corso degli ultimi anni e la produzione di KPC è sempre associata alla produzione di CTX-M-15. La sua diffusione in Italia è particolarmente interessante in quanto consente di tracciare la graduale evoluzione del clone nel tempo, a partire dalla sua prima comparsa a Palermo nel 2008 fino ad arrivare alla sua predominanza sui cloni appartenenti al CC258.

Lo studio del resistoma di *K. pneumoniae* ST307 ha dimostrato che il gene  $bla_{KPC-3}$  è localizzato su plasmidi del tipo pKpQIL-like, caratterizzati dalla presenza di 2 repliconi (FIIk2 and FIB-pKpQIL) in gran parte simili a quelli che circolano nell'ambito dei ceppi del CC258; mentre il gene  $bla_{KPC-2}$  si localizza in 3 tipi di plasmidi differenti: pKpQIL-like, IncN (distinti a loro volta in IncN di tipo A, IncN di tipo B e IncN di tipo C) ed elementi non tipizzabili.



### ***1.3 Scopo della tesi***

Il più recente report dell'Istituto Superiore di Sanità (AR-ISS) relativo alla sorveglianza del fenomeno di antibiotico-resistenza in Italia ha confermato l'endemicità di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi nel nostro Paese. Per di più, i dati di isolamento degli ultimi anni documentano la rapida espansione su tutto il territorio nazionale, rendendo la specie in questione il principale agente infettivo di antibiotico-resistenza in Italia. Alla luce dello stato dell'arte e di quanto riportato finora, l'attuazione di programmi di sorveglianza finalizzati a prevenire la diffusione dei ceppi CRE/CPE rappresenta una necessità inderogabile nel nostro Paese. Nell'ambito degli obiettivi strategici sviluppati dall'OMS in un documento del 2015, uno dei punti salienti riguarda la necessità di rafforzare la base delle conoscenze attraverso la sorveglianza e la ricerca (WHO, 2015). Quest'ultima, in particolare, deve poter fornire informazioni aggiornate sui dati di incidenza e prevalenza di CRE/CPE a vari livelli (nazionale, regionale e locale), sulle dinamiche di diffusione geografica e sulla trasmissione dei geni di resistenza. Altre utili informazioni riguardano le conoscenze relative alla capacità di tali ceppi di persistere a lungo nei pazienti colonizzati. Poiché le *Enterobacteriaceae* fanno naturalmente parte del microbiota intestinale dell'uomo, tamponi rettali e coproculture risultano i campioni più idonei nei protocolli di sorveglianza attiva di ceppi CRE. Per di più, tali campioni possono fornire una base più ampia di sorveglianza e maggiori informazioni per identificare rapidamente sia i cloni internazionali che i nuovi cloni emergenti con l'obiettivo finale di contrastare la loro diffusione sul territorio (Doi et al., 2015).

In base a questi presupposti, la prima parte dello studio ha riguardato la messa a punto di uno screening selettivo di un numero significativo di campioni di feci per la ricerca e l'isolamento di ceppi CRE e CPE. I campioni fecali, raccolti da Ottobre 2018 a Maggio 2019, sono stati ottenuti sia da pazienti ricoverati all'ospedale regionale di Torrette, sia da soggetti esterni o da lungodegenze, sia da pazienti pediatrici dell'ospedale Salesi.

La seconda parte dello studio si è incentrata sulla caratterizzazione di tutti gli isolati di *K. pneumoniae* allo scopo di:

- Valutare la prevalenza di isolati CRE/CPE nel campione di popolazione in esame.
- Caratterizzare il profilo di resistenza degli isolati con analisi fenotipiche e genotipiche.
- Eseguire adeguate prove di genotipizzazione e studi di trasferibilità orizzontale allo scopo di individuare la presenza di eventuali cloni epidemici o nuovi cloni emergenti.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Principali terreni di coltura utilizzati

I principali terreni di coltura impiegati nelle fasi di screening, isolamento, identificazione, realizzazione delle prove di sensibilità agli antibiotici, valutazione della capacità di produrre ESBL ed esecuzione dei saggi di coniugazione sono stati ottenuti tutti dalle ditte OXOID (Garbagnate, MI) e Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, TE) e differiscono tra loro per molti aspetti.

**MacConkey Agar (MC):** terreno di coltura differenziale e selettivo per i batteri Gram-negativi in quanto i sali biliari e il cristalvioletto inibiscono la crescita dei Gram-positivi, mentre il lattosio permette di distinguere i batteri Gram-negativi in lattosio-fermentanti (*K. pneumoniae*, *E. coli*, ...) ed in lattosio-non fermentanti (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., ...) in base al viraggio di colore dell'indicatore di pH rosso neutro (Figura 6).

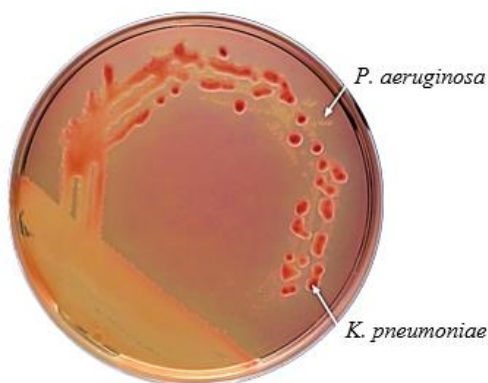


Figura 6 MacConkey Agar. Aspetto e colorazione di colonie lattosio-fermentanti e lattosio-non fermentanti.

**Tryptic Soy Agar (TSA):** terreno di coltura nutritivo non selettivo per la crescita di specie batteriche non particolarmente esigenti dal punto di vista nutrizionale. Questo terreno è stato impiegato sia per coltivare i ceppi isolati conservati in glicerolo a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sia per promuovere la crescita selettiva dei donatori nelle prove di coniugazione, previa supplementazione di  $2\ \mu\text{g/mL}$  di meropenem. La sua variante liquida, nota come **Tryptic Soy Broth (TSB)**, è stata utilizzata nel protocollo di screening per selezionare tutte le *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi a partire da campioni fecali, previa supplementazione di  $0,25\ \mu\text{g/mL}$  di ertapenem.

**Brain Heart Infusion Agar (BHA):** terreno di coltura non selettivo ed altamente nutritivo che contiene delle sostanze in grado di supportare la crescita delle specie batteriche non troppo esigenti dal punto di vista nutrizionale, tra cui destrosio come fonte di carbonio, mistura di peptone di caseina e di carne come fonte di azoto, amminoacidi, sali minerali e vitamine, nonché infuso di cervello di vitello e di cuore di bue per favorire la crescita delle specie batteriche più esigenti. Questo terreno è stato impiegato per coltivare le colonie conservate in glicerolo a -80°C e per altre procedure in sostituzione al TSA; inoltre, anche in tal caso esiste la sua variante liquida, nota come **Brain Heart Infusion Broth (BHB)**.

**Muller Hinton Agar (MHA):** terreno di coltura non selettivo ed appositamente formulato per i test di sensibilità agli antibiotici. La sua variante liquida esiste sotto forma di 2 varianti: **Muller Hinton Broth (MHB)** e **Muller Hinton II Broth (MHIIB)**. In particolare, MHIIB si differenzia da MHB per la presenza di ioni calcio e magnesio, il che lo rende il terreno di elezione per la realizzazione dei test quantitativi di sensibilità agli antibiotici.

**Azide Blood Agar:** terreno di coltura selettivo che, arricchito con del sangue di montone defibrinato, solitamente viene utilizzato per isolare cocchi Gram-positivi da campioni clinici o altri materiali grazie alla presenza del sodio azide come sostanza ad azione batteriostatica su numerose specie batteriche, soprattutto Gram-negative, tramite il blocco dei loro sistemi enzimatici metallo-porfirinici (catalasi e citocromo C ossidasi nel dettaglio). Questo terreno è stato utilizzato nei protocolli di coniugazione per la crescita del ceppo ricevente *E. coli* J53 mutante e resistente al sodio azide (J53<sup>AzR</sup>) e per la selezione dei transconiuganti.

**BHI + Glicerolo al 20%:** terreno di mantenimento per la conservazione a lungo termine dei ceppi di interesse a temperature estremamente ridotte (T = -80°C) grazie alla presenza di un crioprotettivo in grado di proteggere le varie cellule dalla formazione di cristalli di ghiaccio che altrimenti andrebbero inevitabilmente a danneggiare la loro membrana in seguito allo shock termico a cui vengono sottoposte al momento dello scongelamento.

**Chromatic CRE Agar:** terreno di coltura cromogenico, selettivo e differenziale, che è stato specificatamente formulato per la ricerca delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi direttamente da campioni clinici in quanto, oltre alla miscela di peptoni come fonte di azoto, amminoacidi, carbonio, sali minerali e vitamine, contiene anche una miscela cromogenica per la discriminazione delle specie e adeguate concentrazioni di carbapenemi per la selezione dei ceppi resistenti a tali antibiotici (Figura 7 e Tabella interpretativa 1).

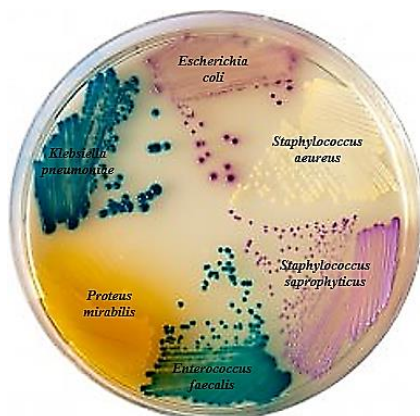


Figura 7 Chromatic CRE Agar. Aspetto e colorazione di varie specie microbiche.

MICROORGANISMO	ASPETTO TIPICO DELLE COLONIE
<i>E. coli</i> resistente ai carbapenemi	Rosso mattone
<i>K. pneumoniae</i> resistente ai carbapenemi	Blu-viola
<i>Enterobacter</i> spp. resistente ai carbapenemi	Blu-verde
<i>Non-Enterobacteriaceae</i> resistenti ai carbapenemi	Incolore, bianco o pigmentazione naturale

Tabella 1 Interpretazione dei risultati.

**Brilliance CRE Agar:** terreno di coltura cromogenico, selettivo e differenziale che viene tipicamente impiegato per identificare in maniera presuntiva *E. coli* e batteri Gram-negativi del gruppo K.E.S.C. (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp.) resistenti ai carbapenemi direttamente da campioni clinici in virtù della particolare miscela cromogenica e degli antibiotici presenti al suo interno (Figura 8 e Tabella interpretativa 2).

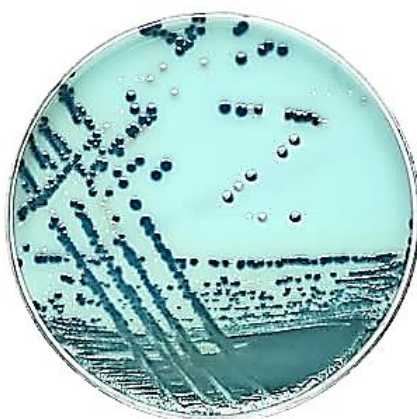


Figura 8 Brilliance CRE Agar. Aspetto e colorazione tipica di *E. coli*, gruppo KESC.

MICRORGANISMO	ASPETTO TIPICO DELLE COLONIE
<i>E. coli</i> resistente ai carbapenemi	Rosa pallido
Gruppo K.E.S.C. resistente ai carbapenemi	Blu
Altri batteri resistenti ai carbapenemi	Incolore, bianco o pigmentazione naturale

Tabella 2 Interpretazione dei risultati.

## 2.2 Protocollo di screening per isolamento e identificazione di CPE

Da Ottobre 2018 a Maggio 2019 sono stati raccolti 650 campioni di feci provenienti dai laboratori di Microbiologia e di Virologia dell'Ospedale Regionale di Torrette e da pazienti ammessi alla Clinica di Malattie Infettive.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad uno screening per la ricerca di *Enterobacterales* carbapenem-resistenti (CRE) tramite un protocollo di arricchimento selettivo in brodo TSB supplementato di 0,25 µg/mL di ertapenem (TSB-E). Minime quantità dei campioni fecali sono state seminate in brodo TSB-E ed incubate *overnight* a 35°C ± 2°C; dopodiché, aliquote pari a 0,1 mL delle brodoculture sono state seminate in MC addizionato con 0,25 µg/mL di ertapenem (MC-E) e nuovamente incubate *overnight* a 35°C ± 2°C.

Successivamente, le colonie sospette per *Enterobacterales* (colonie con morfologia tipica ed ossidasi negative) sono state nuovamente subcoltivate in MC-E al fine di ottenere una coltura pura e poi identificate mediante test biochimici miniaturizzati API system (Biomérieux) o Enterosystem 24R (Liofilchem).

**Test dell'ossidasi:** test semplice e rapido che consente di verificare l'eventuale presenza della citocromo-ossidasi nei batteri Gram-negativi in modo tale da riuscire a distinguere presuntivamente le specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, che sono tutte ossidasi negative, dalle altre specie che risultano invece ossidasi positive.

**Identificazione su base biochimica tramite apposite gallerie:** in linea generale, le gallerie sono composte da un numero ben preciso di micro-provette (gallerie API 20E / 20NE) o di micro-pozzetti (gallerie Enterosystem 24R) sul cui fondo si trova uno specifico substrato liofilizzato che verrà reidratato dopo aggiunta della sospensione batterica standardizzata, la cui torbidità deve essere pari a 0,5 Mc Farland.





In definitiva, la differenza sostanziale tra i 2 sistemi utilizzati per l'identificazione riguarda sia il numero di micro-provette o di micro-pozzetti del dispositivo, sia il tipo di substrati liofilizzati posti al loro interno e il tipo di reagenti necessari prima e dopo l'incubazione.

### ***2.3 Determinazione del profilo di sensibilità/resistenza agli antibiotici***

Una volta identificati, i vari ceppi sono stati sottoposti ad una serie di analisi volte a valutarne il rispettivo profilo di sensibilità e resistenza agli antibiotici. A seconda del tipo di molecole da saggiare sono stati utilizzati test qualitativi di diffusione in agar (antibiogramma), test quantitativi di diluizione (MIC in agar o in brodo) e test epsilometrici di diffusione in agar (E-test).

**Antibiogramma:** metodo qualitativo che si basa sul principio di diffusione degli antibiotici in agar ed è stato messo a punto nel secondo dopoguerra da Kirby-Bauer. La sua procedura consente di stabilire se il ceppo di interesse è sensibile o resistente ad un certo antibiotico. Colture pure dei ceppi in esame cresciute *overnight* a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  vengono sospese in brodo MHB e opportunamente diluite al fine di ottenere una densità ottica di 0,1 [OD misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 625 nm ( $\text{OD}_{625}$ )], corrispondente a  $1 \times 10^8$  Unità Formanti Colonia per mL (CFU/mL). I dischetti degli antibiotici di cui si vuole saggiare l'attività vengono posizionati sterilmente sulla superficie delle piastre di MHA, precedentemente inoculate con la sospensione batterica standardizzata, disponendoli ad una distanza tale da evitare fenomeni di interferenza ed in seguito si incuba il tutto in aerobiosi per 18-24 ore a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Al termine dell'incubazione, si misura il diametro di inibizione (espresso in millimetri) attorno a ciascun dischetto (Figura 12) e il valore ottenuto (*end point*) si mette a confronto con i valori di riferimento (*breakpoints*) del comitato di riferimento EUCAST (EUCAST, 2019) per la corretta interpretazione del risultato (Tabella 3).

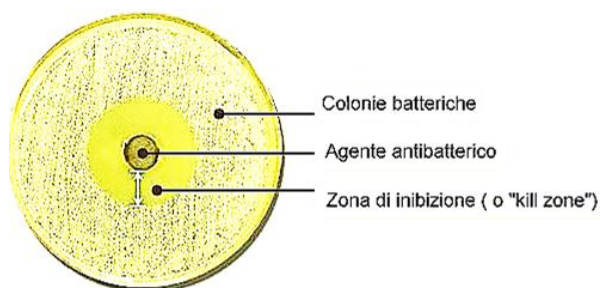


Figura 12 Comparsa di un alone di inibizione dopo incubazione overnight a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

FAMIGLIA	ANTIBIOTICO	BREAKPOINTS Ø INIBIZIONE (mm)		BREAKPOINTS MIC (mg/L)	
		S ≥	R <	S ≤	R >
PENICILLINE					
	Ampicillina	14	14	8	8
	Amoxicillina-acido clavulanico	19	19	8	8
CEFALOSPORINE					
	Cefepime	27	24	1	4
	Cefotaxime	20	17	1	2
	Ceftazidime	22	19	1	4
	Ceftazidime-avibactam	13	13	8	8
CARBAPENEMICI					
	Meropenem	22	16	2	8
	Imipenem	22	17	2	4
	Ertapenem	25	25	0,5	0,5
MONOBATTAMICI					
	Aztreonam	26	21	1	4
FLUOROCHINOLONI					
	Ciprofloxacina	25	22	0,25	0,5
AMINGLICOSIDI					
	Amikacina	18	15	8	16
	Gentamicina	17	14	2	4
	Tobramicina	17	14	2	4
TETRACICLINE					
	Tigeciclina	18	18	0,5	0,5
MISCELLANEA					
	Cloramfenicolo	17	17	8	8
	Trimetoprim-sulfametazolo	14	11	2	4
	Colistina			2	2

Tabella 3 Breakpoint di riferimento dei diametri di inibizione per l'ordine Enterobacterales.

Per monitorare la corretta esecuzione della procedura nei vari esperimenti è necessario usare un ceppo di controllo (*QC strain*) poiché è dotato di un profilo di sensibilità/resistenza ben noto (in tal caso *E. coli* ATCC 25922).

Al fine di ottenere un profilo di sensibilità/resistenza che fosse il più completo possibile, in tale studio il metodo in questione è stato adoperato per saggiare differenti classi di antibiotici (Figura 13): imipenem (IPM–10µg); meropenem (MEM–10µg); ertapenem (ETP–10µg); ampicillina (AMP–10µg); amoxicillina/acido clavulanico (AUG–30µg totali, ripartiti in 20µg + 10µg); aztreonam (ATM–30µg); cefotaxime (CTX–30µg); ceftazidime (CAZ–30µg); cefepime (FEP–30µg); ciprofloxacina (CIP–5µg); cloramfenicolo (CHL–30µg); gentamicina (CN–10µg); trimetoprim-sulfametoxazolo (SXT–25µg totali, ripartiti in 1,25µg + 23,75µg); tobramicina (TOB–10µg); amikacina (AK–30µg); ceftazidime-avibactam (CZA–50µg totali, ripartiti in 30 µg + 20 µg) e tigeciclina (TGC–15µg). Si è anche valutata la possibile interazione sinergica tra l’acido clavulanico contenuto nel dischetto di AUG e gli antibiotici ATM, CTX e CAZ per evidenziare la presenza di ESBLs.

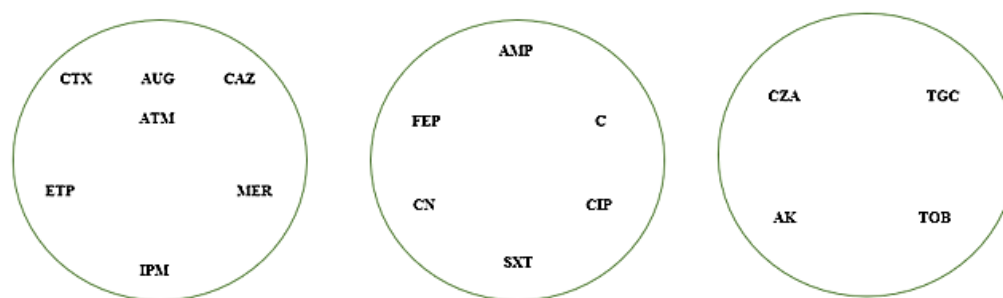


Figura 13 Antibiogramma. Disposizione schematica dei dischetti di antibiotico nelle piastre di MHA.

**Minimal Inhibitory Concentration (MIC o Minima Concentrazione Inibente):** metodo quantitativo, estremamente accurato e riproducibile, che consente di determinare la minima concentrazione di antibiotico, espressa in µg/mL, in grado di inibire la crescita batterica visibile. La procedura di base, che può essere eseguita in agar o in brodo (macrometodo o micrometodo), consiste nel saggiare un inoculo standardizzato del ceppo in esame ( $OD_{625} = 0.1$ ) con diluzioni scalari di antibiotico. Dopo incubazione per 18-24 ore a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , lo specifico *endpoint* di MIC corrisponde al pozzetto (metodo di microdiluzione in brodo) con la più bassa concentrazione di antibiotico dove non si osserva alcuna crescita microbica visibile (Figura 14) e per l’interpretazione dei risultati ci si avvale dei *breakpoints* del comitato di riferimento EUCAST per *Enterobacterales* (Tabella 3).

Anche per questa procedura, proprio come per l’antibiogramma, è fondamentale utilizzare un *QC strain* (in tal caso *E. coli* ATCC 25922) per monitorarne la corretta esecuzione.

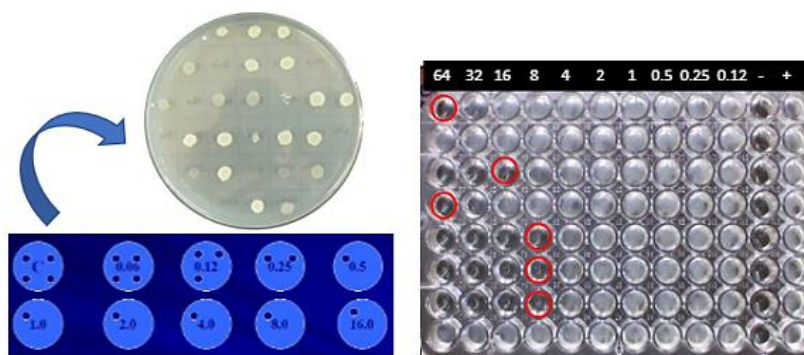


Figura 14 MIC in agar a sinistra, MIC in brodo a destra.

In tale studio il metodo in questione è stato impiegato per saggiare la MIC dei 3 carbapenemi (IPM, MEM, ETP), della colistina e della maggior parte degli antibiotici sopra riportati, come ulteriore conferma del risultato ottenuto mediante i test di diffusione in agar.

**E-TEST:** metodo quantitativo per determinare la MIC di un antibiotico nei confronti del ceppo di interesse mediante la procedura di diffusione in agar descritta in precedenza. Il test utilizza delle strisce reattive, imbevute con un gradiente di concentrazione predefinito di agente antimicrobico e dotate di una scala di lettura graduata. Dopo incubazione per 18-24 ore a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , si può notare la comparsa di un alone di inibizione “a goccia” attorno alla parte superiore di ciascuna striscia reattiva, i cui margini vanno ad intersecare la stessa in corrispondenza del valore di MIC (Figura 15).

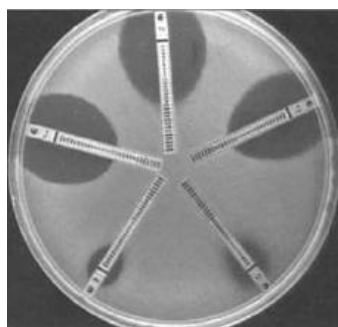


Figura 15 E-test relativo a 5 differenti antibiotici.

In tale studio il metodo in questione è stato utilizzato per saggiare la MIC di ciprofloxacina e ceftazidime/avibactam.

#### ***2.4 Determinazione della capacità di produrre ESBL e carbapenemasi***

La dimostrazione della produzione di ESBL e di carbapenemasi da parte dei batteri in esame è stata evidenziata mediante l'impiego di metodi fenotipici utilizzati di routine in laboratorio.

**Double-Disc Synergy Test (DDST, q o Test di sinergia con un doppio dischetto):** metodo fenotipico che consente di rilevare la produzione di ESBL da parte dei ceppi in esame. La procedura prevede di distribuire in modo uniforme su tutta la superficie della piastra di MHA la sospensione standardizzata del ceppo di interesse ( $OD_{625} = 0.1$ ) e di applicare dischetti di cefalosporine di III generazione (cefotaxime e ceftazidime), in presenza e in assenza del loro inibitore, vale a dire l'acido clavulanico contenuto nel dischetto di AUG. Dopo incubazione *overnight* a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , la produzione di ESBL viene messa in evidenza dalla comparsa di un'interazione sinergica tra cefalosporine e clavulanato, che comporta la formazione di un aumentato alone di inibizione attorno a CTX e CAZ in prossimità del dischetto contenente l'inibitore (Figura 12). Parallelamente è bene eseguire il DDST con un controllo negativo non produttore di ESBL (*E. coli* ATCC 35218) ed un controllo positivo produttore di ESBL (*K. pneumoniae* ATCC 700603).

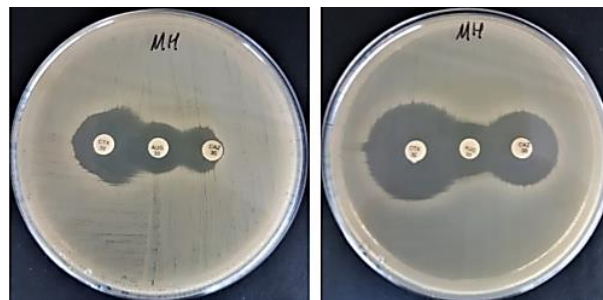


Figura 16 DDST. A sinistra il risultato tipico di un ceppo produttore di ESBL, a destra il risultato tipico di un ceppo non produttore di ESBL.

**Modified Hodge Test (MHT o Test di Hodge modificato):** metodo fenotipico ampiamente utilizzato per rilevare la produzione di carbapenemasi da parte del ceppo in esame, che si basa sul principio secondo cui le carbapenemasi derivanti dal ceppo produttore diffondono nel terreno di saggio (MHA) e determinano una riduzione di sensibilità del ceppo indicatore (*E. coli* ATCC 25922) precedentemente seminato sulla piastra. In breve, si effettua una diluizione 1:10 di un inoculo standardizzato del ceppo indicatore ( $OD_{625} = 0.1$ ) e si semina sulla superficie della piastra di MHA; dopodiché si applica al centro della stessa un dischetto di meropenem (10  $\mu\text{g}$ ) o in alternativa un dischetto di ertapenem (10  $\mu\text{g}$ ). A questo punto si preleva una colonia ben isolata del ceppo in esame e si semina sulla piastra mediante una linea dritta che procede dal bordo del dischetto di antibiotico fino al bordo della piastra stessa e si ripete la procedura con gli altri ceppi da testare fino ad un massimo di quattro per piastra.

A tal proposito, è buona norma usare in parallelo un controllo negativo non produttore di carbapenemasi ed un controllo positivo produttore di carbapenemasi. Dopo incubazione *overnight* a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , la produzione di carbapenemasi viene evidenziata attraverso la formazione di un caratteristico restringimento dell'alone di inibizione del ceppo indicatore in prossimità della striscia del ceppo produttore, che di conseguenza assume un tipico aspetto a “quadrifoglio” (Figura 17).

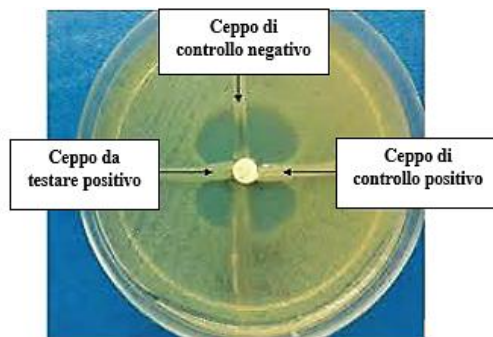


Figura 17 MHT e relativi risultati.

Pur avendo dei vantaggi indiscutibili in termini di costo limitato e facilità di esecuzione, il test risulta relativamente poco specifico e richiede un certo grado di esperienza per la corretta interpretazione dei risultati, di fatti non è raro ottenere dei falsi positivi (ceppi iper-produttori di AmpC o ESBL) o dei falsi negativi (ceppi produttori di MBL) (Girlich et al., 2012).

**Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM o Metodo di inattivazione di un carbapenemico modificato):** metodo fenotipico che consente di rilevare in modo accurato la produzione di carbapenemasi da parte dei batteri Gram-negativi, di fatti si può notare una buona corrispondenza tra i risultati dei metodi in questione ed i risultati della PCR relativa ai geni codificanti le carbapenemasi ( $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{VIM}$  e  $bla_{IMP}$ ). Il test si basa sul principio secondo cui, mettendo a contatto un dischetto di meropenem (10  $\mu\text{g}$ ) con la sospensione di un microrganismo produttore di carbapenemasi, l'enzima diffonde nel mezzo di coltura e determina la degradazione del carbapenemico, che di conseguenza non riuscirà più ad espletare la propria attività inibitoria nei confronti di un ceppo indicatore sensibile. In breve, dopo aver messo a contatto il dischetto di antibiotico con un inoculo del ceppo in esame per 4 ore  $\pm$  15 minuti a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , si posiziona sterilmente il dischetto sulla superficie di una piastra di MHA precedentemente inoculata con la sospensione batterica standardizzata ( $OD_{625} = 0,1$ ) del ceppo indicatore *E. coli* ATCC 25922 e si incuba il tutto *overnight* a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

In seguito, la produzione della carbapenemasi viene interpretata misurando il diametro di inibizione, espresso in millimetri, attorno al dischetto di meropenem trattato e non trattato (Figura 18) e confrontando il risultato ottenuto con i valori di riferimento (Tabella 4) riportati in letteratura (Pierce et al., 2017).

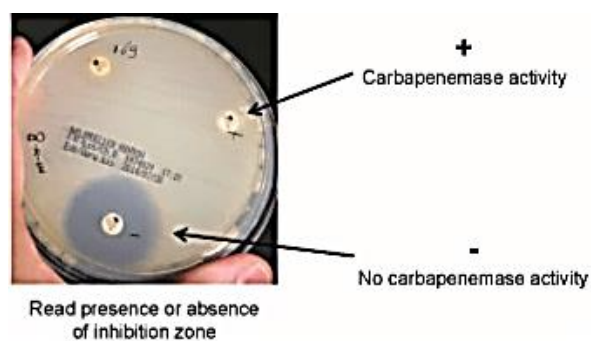


Figura 18 mCIM e relativi risultati.

Ø INIBIZIONE	RISULTATO
6-15 mm	Positivo
16-18 mm	Intermedio
≥ 19 mm	Negativo

Tabella 4 mCIM. Interpretazione dei risultati.

In generale, il test mCIM fornisce risultati più affidabili rispetto al test MHT in quanto presenta valori di sensibilità e specificità elevatissimi (> 99%) e la sua interpretazione è del tutto oggettiva e indipendente dall'operatore (Pierce et al., 2017). Al contrario, il test MHT può fornire spesso dei risultati incerti e difficili da interpretare, ad esempio in presenza di ceppi produttori di carbapenemasi come la metallo-β-lattamasi NDM o ceppi resistenti ai carbapenemi caratterizzati da una combinazione di vari meccanismi di resistenza (Iovleva et al., 2017).

## 2.5 Analisi genotipica

Per poter eseguire una buona analisi genotipica, come prima cosa si deve estrarre il DNA genomico purificato del ceppo di interesse a partire da una coltura fresca e totalmente pura tramite il GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA-ALDRICH, St. Louis), seguendo fedelmente il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

**Estrazione del DNA genomico:** procedura finalizzata alla separazione dello specifico acido nucleico da tutte le altre componenti cellulari, sfruttando una prima fase di lisi delle cellule ad opera di enzimi in grado di rompere parete e membrana cellulare ed una seconda fase di purificazione del campione tale da rimuovere completamente i contaminanti che potrebbero interferire con le successive analisi genotipiche.

**PROTOCOLLO:**

- Preparare una sospensione batterica del ceppo di interesse, stemperando in 1,5 mL di BH o soluzione fisiologica una discreta quantità di colonie prelevate da una coltura fresca e totalmente pura.
- Centrifugare per 2 minuti alla massima velocità (12.000-16.000 xg) e poi rimuovere il surnatante con un movimento netto e deciso in modo tale da non rischiare di perdere pure una parte del pellet.
- Risospendere il pellet con 180 µL di Lysis Solution T e passare al vortex per alcuni secondi per facilitare il distacco del pellet dalla provetta.
- Aggiungere 20 µL di RNasi A Solution, mescolare bene ed incubare il tutto per 2 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 20 µL di Proteinasi K, mescolare bene ed il tutto incubare in termostato per 30 minuti a 55°C.
- Aggiungere 200 µL di Lysis Solution C, passare al vortex per 15 secondi e incubare nuovamente per 10 minuti a 55°C.
- Nel frattempo, inserire una GenElute Miniprep Binding Column in eppendorf da 2 mL, aggiungere 500 µL di Column Preparation Solution, centrifugare per 1 minuto alla massima velocità e rimuovere tutto l'eluato.
- Aggiungere 200 µL di etanolo assoluto (95-100%) al lisato cellulare e passare al vortex per 5-10 secondi in modo da mescolare in maniera omogenea il contenuto.
- Trasferire tutto il lisato cellulare nella colonnina preparata precedentemente, centrifugare per 1 minuto a 6500 xg in modo tale da favorire il fissaggio del DNA alla colonnina stessa ed eliminare tutto l'eluato.
- Trasferire la colonnina cromatografica in una nuova eppendorf, aggiungere 500 µL di Wash Solution 1, centrifugare per 1 minuto a 6500 xg ed eliminare tutto l'eluato.



- Aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di Wash Solution Concentrate, centrifugare per 3 minuti alla massima velocità, eliminare tutto l'eluato e centrifugare nuovamente per 1 minuto alla massima velocità in modo tale da rimuovere ogni traccia di etanolo dalla colonnina cromatografica.
- Trasferire la colonnina cromatografica in una nuova eppendorf, aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di Elution Solution ed incubare il tutto per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Centrifugare per 1 minuto a 6500 xg e, senza rimuovere l'eluato che in tal caso contiene il materiale di interesse, ripetere il passaggio precedente in modo tale da aumentare la resa finale del 20-50%.
- Conservare l'eluato finale (circa 400  $\mu\text{L}$ ), contenente il DNA genomico purificato, in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento del suo utilizzo.

**Polimerase Chain Reaction (PCR o Reazione a catena della Polimerasi):** tecnica di biologia molecolare che consente di produrre milioni di copie identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte di acido nucleico.

Come prima cosa si deve allestire una miscela di reazione con tutte le componenti necessarie al corretto svolgimento della PCR, ciascuna nelle quantità opportune (Tabella 6): frammento di DNA che si vuole amplificare; acqua per portare a volume la soluzione; buffer per mantenere stabile il pH; dNTPs per la costituzione dei vari filamenti di DNA; DNA Polimerasi termoresistente (Taq) per la catalisi della reazione di sintesi;  $\text{MgCl}_2$  come cofattore enzimatico per la stabilità della reazione di amplificazione ed infine coppia di *primers* Forward/Reverse (F/R) complementari alle sequenze fiancheggianti la porzione genica da amplificare per fornire un innesco allo specifico enzima. In seguito si inseriscono le micro-provette nel termociclatore e si imposta il corretto programma di amplificazione relativo alle 3 fasi di cui si compone ogni ciclo (Tabella 7), che in genere viene ripetuto per 30-35 volte a seconda della quantità di DNA iniziale (Figura 19):

1. DENATURAZIONE ( $94-95^{\circ}\text{C}$  per 3-5 minuti): i vari frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA) si separano in 2 singoli filamenti da utilizzare come stampo per la sintesi del complementare.
2. APPAIAMENTO ( $50-60^{\circ}\text{C}$  per 1 minuto): i primers si appaiano per complementarità ai singoli filamenti di DNA presenti nella miscela di reazione.

Per una buona riuscita della reazione è necessario impostare la corretta temperatura di *annealing* ( $T_A$ ), che non è mai fissa, ma varia in funzione della temperatura di *melting* ( $T_M$ ) della coppia di primers prescelta, ossia la temperatura alla quale le molecole di DNA si trovano metà in forma di doppio filamento stabile e metà in forma di singolo filamento. In particolare, la  $T_M$  va calcolata con una specifica formula che tiene conto della precisa composizione dei singoli primers:

$$T_M = [4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)]$$

Solitamente si imposta una  $T_A$  di 1°C inferiore rispetto alla  $T_M$  più bassa della coppia di primers prescelta al fine di garantire una buona resa della reazione.

3. ESTENSIONE (72°C per 1-3 minuti): la Taq allunga i primers attraverso la graduale aggiunta di dNTPs complementari al filamento stampo e, dato che per definizione tale enzima riesce a produrre un filamento di 1 Kb ogni minuto, la durata di questa fase dipende essenzialmente dalla taglia dello specifico amplificato.

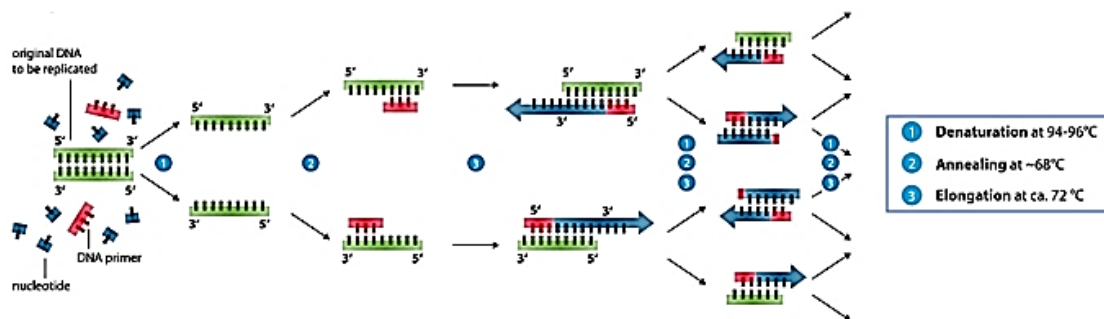


Figura 19 Reazione ciclica della PCR.

Dal punto di vista teorico, dopo  $n$  cicli di PCR si dovrebbero ottenere  $2^n$  frammenti di DNA; tuttavia nella realtà la situazione è un po' diversa: in seguito ad una prima fase esponenziale, in cui si ha il massimo di efficienza (100%) e il quantitativo di DNA raddoppia ad ogni ciclo, infatti, si assiste ad una graduale diminuzione di efficienza, la quale comporta il passaggio dapprima alla fase lineare e poi alla fase di plateau, in cui si ha il minimo di efficienza per la mancanza di una o più componenti di reazione o per la perdita di attività enzimatica.

In tale studio con la tecnica in questione è stata rilevata la presenza dei geni che codificano 4 diverse  $\beta$ -lattamasi ( $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$  e  $bla_{CMY}$ ) nel genoma dei ceppi di interesse, utilizzando di volta in volta primers specifici di letteratura (Tabella 5).

COPPIA DI PRIMERS	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'→3')	TIPO DI GENE	TAGLIA	BIBLIOGRAFIA
CTX-M 1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	593 bp	Pagani 2003
CTX-M 2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA			Pagani 2003
SHV F	CACTCAAGGATGTATTGTG	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	883 bp	Sáenz et al. 2004
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			Sáenz et al. 2004
TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	861 bp	Mugnaioli et al. 2006
TEM R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG			Mugnaioli et al. 2006
CMY F	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	1138 bp	Dierikx 2010
CMY R	GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG			Dierikx 2010

Tabella 5 Caratteri distintivi delle coppie di primers impiegate nella Multiplex PCR.

COMPONENTE	C <sub>INIZIALE</sub>	C <sub>FINALE</sub>	V <sub>FINALE</sub>
Acqua			41,35 µL
Buffer	10X	1X	5 µL
dNTPs	10000 µM	200 Mm	1 µL
Primers	100 µM	0,5 µM	0,25 µL
Dream Taq	5 U/µL	1 U/µL	0,25 µL
DNA			2 µL

Tabella 6 Composizione della mix con volume finale di 50 µL.

FASE DI AMPLIFICAZIONE	CONDIZIONI
Denaturazione iniziale	94°C per 7 minuti (CTX-M) 94°C per 5 minuti (TEM, SHV e CMY)
35 CICLI (CTX-M)/ 30 CICLI (TEM, SHV e CMY): Denaturazione	94°C per 50 secondi (CTX-M) 94°C per 1 minuto (TEM, SHV e CMY)
Appaiamento	50°C per 40 secondi (CTX-M) 53°C per 1 minuto (TEM e SHV) 63°C per 1 minuto (CMY)
Allungamento	72°C per 1 minuto
Allungamento finale	72°C per 5 minuti

Tabella 7 Programma di amplificazione.

**Multiplex PCR:** tecnica di biologia molecolare che si basa sulla PCR e permette di rilevare la presenza di più geni nella stessa miscela di reazione.

In tale studio con la tecnica in questione è stata rilevata la presenza dei geni codificanti le principali carbapenemasi ( $bla_{VIM}$ ,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  e  $bla_{OXA-48}$ ), secondo il protocollo di riferimento (Poirel et al., 2011) (Tabelle 8, 9 e 10). Per di più, al termine della procedura tutti gli amplificati relativi al gene  $bla_{KPC}$  sono stati sequenziati e poi sottoposti ad analisi bioinformatica al fine di risalire alla specifica variante allelica.

COPPIA DI PRIMERS	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'→3')	TIPO DI GENE	TAGLIA	BIBLIOGRAFIA
IMP F	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC	$bla_{IMP}$	232 bp	Ellington et al. 2007
IMP R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			Poirel et al. 2011
VIM F	GATGGTGTGGTTCGCATA	$bla_{VIM}$	390 bp	Poirel et al. 2011
VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG			Poirel et al. 2011
OXA F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	$bla_{OXA-48}$	438 bp	Poirel et al. 2011
OXA R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			Poirel et al. 2011
NDM F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	$bla_{NDM}$	621 bp	Poirel et al. 2011
NDM R	CGGAATGGCTCATCACGATC			Poirel et al. 2011
KPC F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	$bla_{KPC}$	798 bp	Poirel et al. 2011
KPC R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			Poirel et al. 2011

Tabella 8 Caratteristiche distintive delle coppie di primers impiegate nella Multiplex PCR.

COMPONENTE	C <sub>INIZIALE</sub>	C <sub>FINALE</sub>	V <sub>FINALE</sub>
Acqua			40,70 $\mu$ L VIM/IMP 40,30 $\mu$ L KPC/NDM/OXA-48
Buffer	10X	1X	5 Ml
dNTPs	10000 $\mu$ M	200 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primers	100 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,20 $\mu$ L
Dream Taq	5 U/ $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
DNA			2 $\mu$ L

Tabella 9 Composizione della mix con volume finale di 50  $\mu$ L.

FASE DI AMPLIFICAZIONE	CONDIZIONI
Denaturazione iniziale	94°C per 10 minuti
35 CICLI:	
Denaturazione	94°C per 30 secondi
Appaiamento	52°C per 40 secondi
Allungamento	72°C per 50 secondi
Allungamento finale	72°C per 5 minuti

Tabella 10 Programma di amplificazione della Multiplex PCR.

**Corsa elettroforetica su gel di agarosio:** metodo più comune per la visualizzazione di un risultato di PCR in quanto si serve di un campo elettrico costante per separare le molecole di acido nucleico unicamente in base al loro peso molecolare.

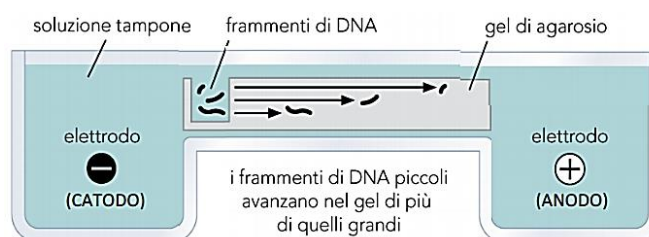


Figura 20 Migrazione differenziale dei frammenti di DNA da catodo ad anodo in presenza di un campo elettrico.

Innanzitutto si prepara il gel di agarosio 1% (1 g di agarosio disciolto in 100 mL di TAE 1X) e si aggiungono al suo interno 300 µL di Green Gel, una sostanza fluorescente che funge da intercalante e dunque consente la successiva visualizzazione del DNA al transilluminatore; dopodichè lo si lascia solidificare nello specifico supporto.

In seguito si alloggia tale supporto nella cella elettroforetica contenente TAE 1X, si rimuove il pettine e si procede al caricamento di 10 µL di ogni campione, precedentemente mescolato con 2 µL di Loading Dye e di 5 µL di marker 100 bp Plus.

Nello specifico, il Loading Dye è una miscela costituita sia da xilene cianolo (nella corsa elettroforetica equivale ad un frammento di 3000 bp), blu di bromofenolo (nella corsa elettroforetica equivale ad un frammento di 300 bp) e orange G (nella corsa elettroforetica equivale ad un frammento di 30 bp) per seguire visivamente la migrazione differenziale, sia da glicerolo per facilitare la deposizione del DNA sul fondo del pozzetto; di conseguenza la sua presenza è fondamentale per riuscire a visualizzare le eventuali bande di amplificazione.

Il marker 100 bp Plus, invece, è un marcatore molecolare costituito da una serie di frammenti di DNA con peso molecolare noto; pertanto consente di monitorare la qualità della corsa elettroforetica e di stimare la dimensione molecolare dei vari amplificati (range: 100 bp - 3000 bp).

A questo punto, si chiude la camera elettroforetica e si avvia il sistema impostando un voltaggio costante di + 90V tra catodo ed anodo. Al termine della migrazione differenziale, si rimuove il supporto con il gel dalla cella elettroforetica e lo si sottopone alla osserva al transilluminatore: in caso di esito positivo si nota una banda netta lungo il canale di corsa dello specifico pozzetto; in caso di esito negativo non si rileva alcun segnale e in presenza di DNA degradato si osserva uno smear lungo tutto il canale di corsa dello specifico pozzetto, il che sta ad indicare la necessità di ripetere la procedura da capo.

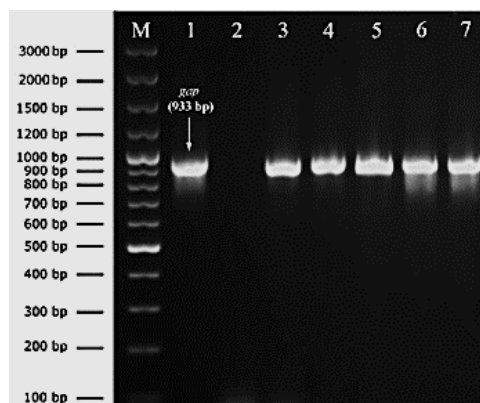


Figura 21 Possibile risultato della corsa elettroforetica al transilluminatore.

## 2.6 Tipizzazione

La tipizzazione consiste nella caratterizzazione a livello sub-specifico della specie microbica di interesse e rappresenta un aspetto di grande rilievo in quanto consente di stabilire se i ceppi in esame appartengono o meno allo stesso clone epidemico, il quale corrisponde ad un cluster di microrganismi geneticamente correlati tra loro e morfologicamente indistinguibili o talmente tanto simili da supporre che discendano da un progenitore comune. Il metodo, infatti, fornisce una serie di dati relativi alla distanza genetica o distanza evolutiva presuntiva dei ceppi in modo tale da riuscire a stabilire il tipo di relazione genetica corrispondente: indistinguibili, strettamente correlati, probabilmente correlati e non correlati.

Ad oggi esistono moltissimi metodi di tipizzazione e la scelta del migliore dipende dal tipo di indagine che si vuole condurre (studio epidemiologico a breve o a lungo termine) e dal tipo di microrganismo in esame.

In tale studio i metodi di tipizzazione molecolare adottati per il confronto dei ceppi di *K. pneumoniae* isolati da campioni fecali riguardano analisi di restrizione con XbaI seguite da elettroforesi in campo pulsato (PFGE) ed analisi Multi-Locus Sequence Typing (MLST).

**Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE o elettroforesi in campo pulsato), preceduta dalla digestione con XbaI:** metodo per la caratterizzazione e il raggruppamento in clusters dei ceppi batterici appartenenti alla stessa specie in funzione delle loro caratteristiche genotipiche e, nonostante sensibilità e potere discriminatorio dipendano dalla tipologia di microrganismo in esame, la sua alta rilevanza epidemiologica lo rende il “gold standard” per la subtipizzazione di batteri patogeni.

La procedura generale consta di più fasi successive, ciascuna delle quali presenta dei parametri che sono stati estrapolati da un protocollo di riferimento ([Hunter et al., 2005](#)) e in alcune prove parzialmente modificati al fine di migliorare la separazione elettroforetica dei genomi di *K. pneumoniae*:

- Preparazione delle plugs, mescolando la sospensione batterica standardizzata ( $OD_{625} = 0,570-0,820$ ), che è stata realizzata a partire da una coltura fresca e pura del ceppo in analisi, con un egual volume di Low Melting-Point Agarose 1,6% (Bio-Rad, Hercules, California, USA) prima di dispensarla in appositi stampi noti come plug-mold.
- Lisi di cellule in situ, incubando per minimo 2 ore a 54°C le plugs solidificate in una soluzione costituita da 5 mL di Cells Lysis Buffer e 25 µL di proteinasi K.
- Purificazione delle plugs da detriti cellulari, tampone e proteinasi K, eseguendo vari lavaggi a 54°C ed in agitazione, di cui i 2 iniziali con acqua ultrapura riscaldata ed i 4 restanti con TE riscaldata.
- Digestione enzimatica, incubando *overnight* a 37°C una singola plug per ceppo in una soluzione composta da enzima di restrizione, buffer e acqua nuclease-free, ciascuno nelle giuste proporzioni. Trascorso il tempo opportuno, si blocca subito la digestione con 500 µL di EDTA 0,5 M.

DIGESTIONE CON XbaI	
Acqua	131 $\mu$ L
Buffer	15 $\mu$ L
Enzima (10 U/ $\mu$ L $\rightarrow$ 40 U/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L

Tabella 11 Composizione relativa della soluzione di digestione.

- Caricamento del pettine, fissando il marker Lambda PFGE Ladder (New England, Biolabs) e le plugs su ciascun dentello con circa 20  $\mu$ L di Low-melting-point Agarose 1% e successivo fissaggio dello stesso nel gel di agarosio. La presenza del marker è fondamentale in quanto consente di determinare i pesi molecolari di ciascuna banda al fine di interpretare il più correttamente possibile il risultato.
- Avvio della corsa elettroforetica, inserendo il supporto con il gel nello spazio apposito e ricoprendolo con il tampone di corsa TBE 0,5X. Per finire, si impostano le condizioni di corsa ottimali e si fa partire la migrazione.

CONDIZIONI DI CORSA CON XbaI	
Tempo	22 ore
Intervallo di switch	2,2 -54,2 secondi

Tabella 12 Condizioni di corsa della PFGE per *K. pneumoniae*.

- Colorazione con Bromuro di Etidio concentrato 0,5  $\mu$ g /mL, immergendo il gel di agarosio prima al suo interno per 30-45 minuti e poi in acqua ultrapura per 5-10 minuti.
- Visualizzazione al transilluminatore, interpretazione dei risultati con i criteri di lettura di Tenover ([Tenover et al., 1995](#)) e successiva realizzazione del dendrogramma, ossia una rappresentazione grafica della corretta ripartizione gerarchica dei vari ceppi in clusters differenti in base alla loro reale distanza evolutiva, tramite il BioNumerics software version 7.0 (Applied Maths Scientific Software Development, Sint-Martens-Latem, Belgium).

La lettura dei risultati è piuttosto complessa e molto spesso si commettono degli errori di interpretazione in quanto banali eventi, come perdita o acquisizione di un sito di restrizione oppure inserzione o delezione di un profago a livello genomico, apportano differenze significative nel profilo di PFGE.



CATEGORIA	N° DI DIFFERENZE GENETICHE RISPETTO AL CEPPO OUTBREAK	N° DI DIFFERENZE DI BANDE RISPETTO AL PATTERN DEL CEPPO OUTBREAK	INTERPRETAZIONE EPIDEMIOLOGICA
Indistinguibili	0	0	Gli isolati fanno parte dello stesso outbreak
Strettamente correlati	1	2-3	Gli isolati sono probabilmente parte del ceppo outbreak
Probabilmente correlati	2	4-6	Gli isolati sono possibilmente parte del ceppo outbreak
Non correlati	≥ 3	≥ 7	Gli isolati non sono parte del ceppo outbreak

Tabella 13 Criteri di interpretazione dei pattern di PFGE.

**Multi-Locus Sequence Typing (MLST):** metodo per la caratterizzazione delle relazioni genetiche esistenti tra ceppi evolutivamente molto lontani tra loro, che si basa dapprima sulla amplificazione di una porzione interna di 7 geni *housekeeping* della specie in considerazione mediante primers specifici (Tabella 14) e programmi di amplificazione ben precisi (Tabella 15) e successivamente sul sequenziamento a doppio filamento tramite il metodo di Sanger (Diancourt et al., 2005).

COPPIA DI PRIMERS	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'→3')	LOCUS GENICO	TAGLIA
F: VIC3 R: VIC2	GGCGAAATGGCWGAGAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	rpoB (subunità β della RNA polimerasi B)	501 bp
F: gapA173 R: gapA181	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	gapA (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi)	450 bp
F: mdh130 R: mdh867	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	mdh (malato deidrogenasi)	477 bp
F: pgi1F R: pgi1R	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGTTAAT	pgi (fosfato isomerasi)	432 bp
F: phoE604.1 R: phoE604.2	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	phoE (fosforina E)	420 bp
F: infB1F R: infB1R	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	infB (fattore di inizio della trascrizione 2)	318 bp
F: tonB1F R: tonB2R	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	tonB (trasduttore di energia periplasmatico)	414 bp

Tabella 14 Caratteristiche distintive delle coppie di primers impiegate nella MLST PCR.

FASE DI AMPLIFICAZIONE	CONDIZIONI
Denaturazione iniziale	94°C per 2 minuti
35 CICLI: Denaturazione	94°C per 20 secondi
Appaiamento	50°C per 30 secondi (rpoB, mdh, pgi, phoE, infB) 45°C per 30 secondi (tonB) 60°C per 30 secondi (gapA)
Allungamento	72°C per 30 secondi
Allungamento finale	72°C per 5 minuti

Tabella 15 Programma di amplificazione della PCR.

Al termine della procedura, per ogni ceppo si ottiene un codice numerico di 7 cifre, derivante dalla combinazione della specifica variante allelica dei 7 geni, grazie al quale è possibile risalire al Sequence Type (ST) corrispondente, inserendo il codice nel rispettivo programma online ([www.pubmlst.org/k.pneumoniae](http://www.pubmlst.org/k.pneumoniae)).

## 2.7 Analisi plasmidica

Dal momento che i geni per la resistenza ai carbapenemi in diverse specie CRE solitamente sono veicolati da plasmidi coniugativi, gli isolati di *K. pneumoniae* sono stati sottoposti ad una caratterizzazione molecolare del contenuto plasmidico mediante analisi di restrizione con la nucleasi S1 seguita da PFGE (Hunter et al., 2005). Il metodo consente di ottenere il profilo plasmidico dei ceppi di interesse e di stabilire approssimativamente le dimensioni dei singoli plasmidi presenti al loro interno. La procedura si avvale delle stesse plugs sottoposte ad analisi genotipica XbaI-PFGE ed impiega una differente incubazione per favorire la loro digestione da parte della nucleasi S1 (Thermo Scientific), un enzima ottenuto da *Aspergillus oryzae* che agisce sui frammenti di dsDNA eliminando tutte le regioni a singolo filamento, le quali possono essere causate da *nick*, *gap* o *mismatch*. In particolare, la digestione enzimatica prevede di incubare una singola plug per campione di DNA genomico per 30 minuti a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) in una soluzione contenente enzima S1, buffer e acqua nuclease-free nelle giuste proporzioni (Tabella 16).

DIGESTIONE CON S1 NUCLEASE	
Acqua	119 $\mu$ L
Buffer	30 $\mu$ L
Enzima	1 $\mu$ L

Tabella 16 Composizione relativa della soluzione di digestione.

Trascorso il tempo opportuno, senza bloccare la digestione, si carica il pettine con il marker Lambda PFGE Ladder (New England, Biolabs) e le plugs e si avvia la corsa elettroforetica in tampone di corsa TBE 0,5X secondo le condizioni di corsa riportate in Tabella 17.

CONDIZIONI DI CORSA CON S1	
Tempo	18 ore
Intervallo di switch	0,5 -20 secondi

Tabella 17 Condizioni di corsa della PFGE per *K. pneumoniae*.

## 2.8 Prove di trasferimento interspecifico di plasmidi contenenti il gene *bla<sub>KPC</sub>*

**Coniugazione:** processo di trasferimento genico orizzontale che richiede una stretta interazione tra la cellula donatrice e la cellula ricevente.

In tale studio gli esperimenti di coniugazione sono stati condotti mediante una procedura di incrocio interspecifico su membrana filtrante, usando i ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi come donatori ed *E. coli* J53<sup>AzR</sup> come ricevente.

Colture *overnight* in TSB di donatore e ricevente vengono opportunamente diluite fino ad ottenere una sospensione con torbidità pari a 0,5 Mc Farland ( $OD_{650} = 0.1$ ) e mescolate in rapporto 1:10 (0,2 mL di donatore + 1,8 mL di ricevente) in soluzione fisiologica. A questo punto si trasferisce la miscela su un filtro Millipore da 0,45  $\mu$ m e, al termine della filtrazione, il filtro viene prelevato quindi in maniera sterile, depositato sulla superficie di una piastra di TSA e messo ad incubare per 3-4 ore a 37°C. Trascorso il tempo opportuno, il filtro viene inserito in un provettone, sospeso in 10 mL di soluzione fisiologica ed infine agitato meccanicamente al vortex per facilitare il distacco delle cellule dalla sua superficie. In un secondo momento, si elimina il filtro e si sottopone il contenuto del provettone ad una centrifugazione a 4'500 rpm per 10 minuti in modo tale da ottenere un pellet interamente costituito da cellule batteriche, il quale verrà poi risospeso in 1 mL di soluzione fisiologica.

Per la conta di donatore e ricevente si effettuano delle diluizioni seriali a partire dall'intero fino alla diluizione  $10^{-8}$  e le aliquote di ciascuna diluizione (0,1 mL) vengono piastrate sia in TSA addizionato di 2  $\mu\text{g/mL}$  di meropenem per la conta del donatore, sia in Azide Blood Agar per la conta del ricevente.

Per la selezione dei transconiuganti, invece, si semina il pellet residuo sulla superficie di piastre di Azide Blood Agar supplementato con 2  $\mu\text{g/mL}$  di meropenem. Dopo incubazione per 24-48 ore a  $37^{\circ}\text{C}$  si procede alla conta delle colonie cresciute su ciascuno dei terreni seminati e si calcola la media delle CFU/mL presenti in modo tale da definire la frequenza di trasferimento mediante la seguente formula:

$$\text{FREQUENZA DI TRASFERIMENTO} = \frac{\text{CFU/mL transconiugante}}{\text{CFU/mL ricevente}}$$

Le colonie sospette cresciute nella piastra di selezione per i transconiuganti vengono poi subcoltivate su Azide Blood Agar + 2  $\mu\text{g/mL}$  di Meropenem e sottoposte ad approfondite analisi fenotipiche e genotipiche sia per escludere la comparsa di mutanti resistenti, sia per caratterizzare il materiale genetico trasferito.

### **2.9 Analisi molecolare dei plasmidi presenti in ceppi di *K. pneumoniae* KPC+**

Lo studio approfondito dei plasmidi si prefigge di stabilire la tipologia ed il gruppo di incompatibilità (Inc) corrispondente e si basa sia su varie analisi di PCR per la ricerca dei principali marcatori dei plasmidi pKpQIL-like (QIL hsdR F1/R1; K2 repB F1/R1; FIIK-traIF/R e FIIK-RepA F/R) e dei plasmidi IncN (istB/tnpAR), che sono portatori del gene *bla*<sub>KPC</sub>, nonché dei plasmidi pKPN-like (aac(6')-Ib F/R), sia su PBRT 2.0 kit ([Carattoli et al. 2005](#), [García-Fernández A. et al. 2009](#), [Villa et al. 2010](#)).

**PBRT (PCR based replicon typing):** metodo molecolare che permette di effettuare una buona tipizzazione in maniera semplice e rapida dei plasmidi che si rendono responsabili del fenomeno di antibiotico-resistenza tramite la realizzazione di 8 multiplex-PCR che consentono di andare ad amplificare 25 repliconi rappresentativi dei principali gruppi di incompatibilità.

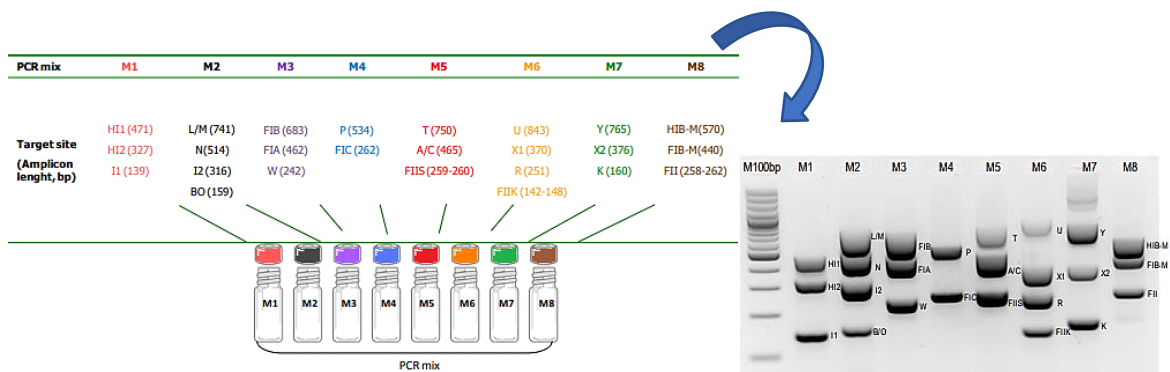


Figura 22 Mix di PCR con i relativi repliconi e risultato rappresentativo della corsa elettroforetica derivante dalle multiplex PCR con i soli controlli positivi.

Per la buona riuscita della procedura, si devono non solo rispettare scrupolosamente quantità relative delle varie componenti di ciascuna mix e programma di amplificazione riportati nel protocollo del kit commerciale (Diatheva, Cartoceto) (Tabelle 18 e 19), ma anche utilizzare sempre i controlli positivi relativi alle varie mix.

COMPOSIZIONE PER UN CAMPIONE	COMPOSIZIONE PER N CAMPIONI
23,8 µL mix + 0,2 µL DNA polimerasi	(N x 23,8) µL mix + (N x 0,2) µL DNA polimerasi
1 µL DNA per campione	1 µL DNA per campione

Tabella 18 Mix di reazione.

FASE DI AMPLIFICAZIONE	CONDIZIONI
Denaturazione iniziale	95°C per 10 minuti
30 CICLI:	
Denaturazione	95°C per 60 secondi
Appaiamento	60°C per 30 secondi
Allungamento	72°C per 60 secondi
Allungamento finale	72°C per 5 minuti

Figura 23 Programma di amplificazione della PBRT.

Al termine della procedura, si effettua la corsa elettroforetica su gel di agarosio 2,5% per risolvere i frammenti e migliorare l'interpretazione dei risultati. I vari ceppi possono contenere più di un plasmide e ogni plasmide può ospitare più di un replicone (plasmidi multi-repliconi). Per di più, dal momento che gran parte dei repliconi ha dimostrato di conferire incompatibilità al plasmide, la rilevazione di uno di essi consente di assegnare provvisoriamente il plasmide in questione ad uno specifico gruppo di incompatibilità.

### 3. RISULTATI

Dallo screening realizzato per isolare e identificare i batteri resistenti ai carbapenemi (CRE e CPE) a partire da campioni fecali sono stati ottenuti 51 isolati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (positività pari al 7,85%) su un totale di 650 campioni.

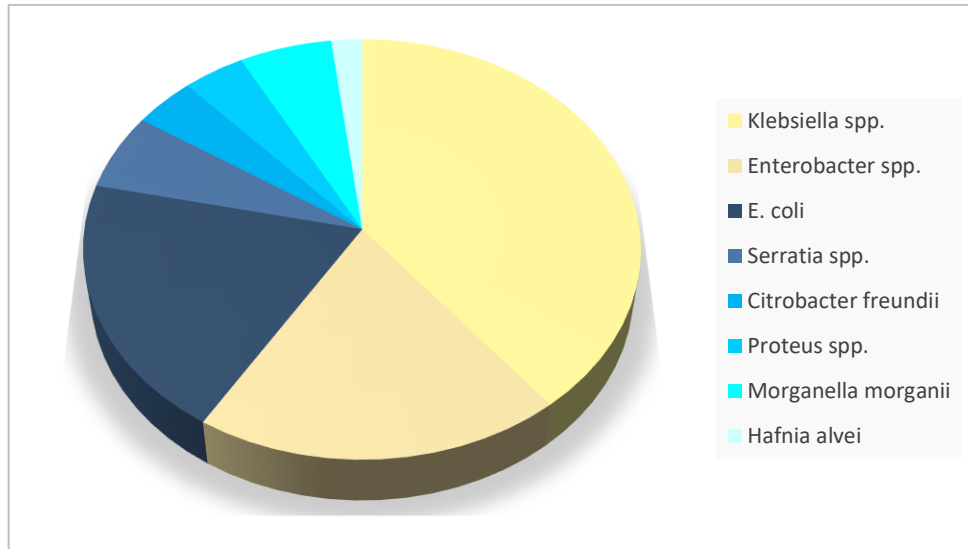


Figura 24 Composizione relativa dei ceppi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* positivi allo screening.

In ordine di frequenza, le specie risultate positive allo screening sono le seguenti: *Klebsiella* spp. (n. 19 ceppi di *K. pneumoniae* e n. 1 ceppo di *K. pneumoniae* subspecie *ozaenae*, il che corrisponde al 39,21% di tutte le *Enterobacteriaceae*); *E. coli* ed *Enterobacter* spp. (n. 10 ceppi entrambe); *Serratia* spp. e *Morganella morganii* (n. 3 ceppi entrambe); *Citrobacter freundii* e *Proteus* spp. (n. 2 ceppi entrambe) ed infine *Hafnia alvei* (n. 1 ceppo).

Data la netta prevalenza di *Klebsiella* spp. rispetto a tutte le altre *Enterobacteriaceae*, tale studio si è totalmente focalizzato sulla caratterizzazione dei ceppi in questione anche in funzione della notevole importanza che la specie riveste a livello mondiale in ambito clinico, sanitario ed economico, soprattutto nel caso in cui risulti resistente ai carbapenemi.

#### 3.1 Determinazione del profilo di sensibilità/resistenza agli antibiotici

Tutti i ceppi di *Klebsiella* spp. positivi allo screening sono stati valutati per la loro sensibilità a numerose classi di antibiotici, utilizzando sia metodi di diffusione in agar che metodi di diluizione (Tabella 19).

CEPPO	IPM	MEM	ETP	ATM	CAZ	CTX	FEP	CN	AK	CIP	SXT	COL	TGC	CHL	CATEGORIE
72504	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-
33051	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	MDR
55112	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
72134	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	MDR
69988/1	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	MDR
69988/2	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	XDR
506206	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	XDR
506362	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S	MDR
MEM	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
506594	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
507382	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	R	I	XDR
37080	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
508650	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S	MDR
511439	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	MDR
514205	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	MDR
514041	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S	MDR
522445	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	XDR
525173	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	XDR
38042	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	MDR
45993	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	XDR

Tabella 19 Profilo di sensibilità/resistenza dei ceppi di *Klebsiella spp.* e relativa classificazione.

Tutti gli isolati erano resistenti all'ertapenem (n. 20 ceppi), ma mostravano percentuali di resistenza variabili nei confronti degli altri carbapenemi, che di fatti oscillavano dal 60% di resistenza (n. 12 ceppi) per l'imipenem fino al 70% di resistenza (n. 14 ceppi) per il meropenem. Per di più, il 60% degli isolati (n. 12 ceppi) era francamente resistente a tutti e 3 i carbapenemi e quasi la totalità risultava resistente ad aztreonam e cefalosporine di III (cefotaxime e ceftazidime) e IV generazione (cefepime).

Per quanto riguarda lo studio degli antibiotici non  $\beta$ -lattamici, solo la colistina risultava attiva su tutti i ceppi in analisi, mentre per le altre molecole sono state ottenute percentuali di resistenza variabili, che di fatti andavano da un minimo di 50% per aminoglicosidi (gentamicina e amikacina) ad un valore massimo di 85% per trimetoprim-sulfametoxazolo e ciprofloxacina. Un risultato importante è quello relativo alla resistenza/non sensibilità alla tigeciclina, che si è attestata complessivamente all'80% (n. 15 ceppi resistenti e 1 ceppo non sensibile).

In aggiunta, 2 isolati (10%) erano resistenti alla combinazione ceftazidime/avibactam, la quale è costituita da una cefalosporina a spettro esteso con un nuovo potente inibitore di  $\beta$ -lattamasi attivo su tutti gli enzimi di classe A (KPC inclusa) e di classe C e su qualche enzima di classe D (OXA-48 compresa) e rappresenta una delle attuali opzioni terapeutiche per il trattamento di infezioni complicate e di polmoniti ospedaliere sostenute da Gram-negativi MDR (Wright et al., 2017).

Alla luce di quanto appena detto, tutti i ceppi sono stati classificati come MDR (45%) o XDR (50%) (Magiorakos et al., 2012), fatta eccezione per un solo isolato che era resistente solo ad ertapenem e cloramfenicolo.

### ***3.2 Determinazione della capacità di produrre ESBL e carbapenemasi***

Tutti i ceppi di *Klebsiella* spp. positivi allo screening sono stati valutati per la loro capacità di produrre ESBL e carbapenemasi rispettivamente tramite il test fenotipico DDST e tramite i test fenotipici MHT e mCIM.

Il 20% degli isolati (n. 4 ceppi) era produttore di ESBL; mentre il 25% di essi (n. 5 ceppi) risultava produttore di carbapenemasi per entrambi i test fenotipici corrispondenti.

### ***3.3 Analisi genotipica***

Tutti i ceppi di *Klebsiella* spp. positivi allo screening sono stati valutati per la possibile presenza di geni codificanti le principali carbapenemasi (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>) mediante la tecnica di Multiplex PCR (Poirel et al., 2011) e, nei casi dubbi (presenza di 2 bande di amplificazione o di un risultato debolmente positivo), le indagini sono state ripetute utilizzando una singola coppia di primers specifici.

Tutti i prodotti di amplificazione sono stati successivamente sottoposti al sequenziamento in modo tale da confermare l'identificazione dei geni e risalire alla specifica variante allelica.



CEPPO	CARBAPENEMASI				
	KPC	NDM	OXA-48	VIM	IMP
72504	-	-	-	-	-
33051	-	-	-	-	-
55112	-	-	-	-	-
72134	-	-	-	-	-
69988/1	-	-	-	-	-
69988/2	-	-	-	-	-
506206	-	-	-	-	-
506362	+	-	-	-	-
MEM	-	-	-	-	-
506594	-	-	-	-	-
507382	+	-	-	-	-
37080	-	-	-	-	-
508650	+	-	-	-	-
511439	+	-	-	-	-
514205	-	-	-	-	-
514041	+	-	-	-	-
522445	-	-	-	-	-
525173	-	-	-	-	-
38042	-	-	-	-	-
45993	-	-	-	-	-

Tabella 20 Risultati della PCR per la ricerca di geni codificanti le  $\beta$ -lattamasi.

La ricerca dei geni  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{NDM}$  e  $bla_{OXA-48}$  non ha riscontrato alcuna positività; al contrario, la ricerca di  $bla_{KPC}$  ha fornito esito positivo per tutti e 5 i ceppi che erano risultati produttori di carbapenemasi secondo i test fenotipici MHT e mCIM.

Conseguentemente, gli amplificati positivi per  $bla_{KPC}$  sono stati sequenziati, evidenziando che 4 ceppi presentavano la variante allelica KPC-2 e un solo ceppo possedeva la variante allelica KPC-3.

I risultati relativi alla ricerca di altri geni di  $\beta$ -lattamasi ( $bla_{TEM}$  e  $bla_{SHV}$ ), ESBL ( $bla_{CTX-M}$ ) e cefalosporinasi a codificazione plasmidica ( $bla_{CMY}$ ) mediante PCR sono tutti riportati in Tabella 21.

CEPPO	ALTRI GENI <i>bla</i>			
	TEM	SHV	CTX-M	CMY
72504	-	+	-	-
33051	+	+	+	-
55112	+	-	+	-
72134	-	-	-	-
69988/1	-	-	-	-
69988/2	-	+	+	-
506206	-	+	+	-
506362	+	-	+	-
MEM	+	+	+	-
506594	+	-	+	-
507382	+	-	+	-
37080	+	-	+	-
508650	+	+	+	-
511439	-	-	+	-
514205	-	-	+	-
514041	+	-	+	-
522445	+	-	+	-
525173	+	-	+	-
38042	+	-	-	-
45993	+	+	+	-

Tabella 21 Risultati della PCR per la ricerca di geni codificanti e  $\beta$ -lattamasi.

Nessun ceppo era positivo per il gene *bla*<sub>CMY</sub>; mentre gli altri geni sono stati identificati sia singolarmente che in diverse combinazioni. A tal proposito, il 65% degli isolati (n. 13 ceppi) risultava positivo al gene *bla*<sub>TEM</sub>; il 35% (n. 7 ceppi) era positivo al gene *bla*<sub>SHV</sub> e l'80% (n. 16 ceppi) risultava positivo al gene *bla*<sub>CTX-M</sub>. Per di più, il 20% degli isolati (n. 4 ceppi) era positivo per *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>; il 40% (n. 8 ceppi) risultava positivo per *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> e il 10 % (n. 2 isolati) era positivo per *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Infine, il 10% degli isolati (n. 2 ceppi) risultava negativo per tutti i geni *bla* ricercati.

### 3.4 Tipizzazione

La PFGE preceduta dalla digestione enzimatica con XbaI ha permesso di stabilire il grado di correlazione filogenetica esistente tra i vari ceppi in esame, fatta eccezione per il singolo isolato di *K. pneumoniae* subspecie *ozaenae* che non è tipizzabile mediante XbaI.

N°	ID	PULSOTIPO
1	72504	B
2	33051	C
3	55112	D
4	72134	E
5	69988/1	F
6	69988/2	G
7	506206	H
8	506362	A
9	MEM	A1
10	506594	D
11	507382	I
12	37080	A2
13	508650	A3
14	511439	A4
15	514205	J
16	514041	A
17	522445	K
18	525173	K
19	38042	NT
20	45993	A5

Tabella 22 Tipizzazione dei 20 ceppi di *K. pneumoniae* mediante *XbaI*-PFGE ed interpretazione dei pulsotipi utilizzando criteri di letteratura (Tenover et al., 1995).

L'analisi dei profili di digestione *XbaI* mediante i criteri di letteratura (Tenover et al., 1995) evidenziava l'esistenza di un clone principale A (2 ceppi identici) e di un cluster costituito da ceppi con 3 bande differenti (strettamente correlati) ed altri con 5-6 bande di differenza (probabilmente correlati) (Tabella 22). Il ceppo 507382 (pulsotipo I) mostrava un profilo identico a quello precedentemente riportato per il clone endemico ospedaliero ST512 (Brescini et al., 2019), che rappresenta il clone internazionale maggiormente diffuso in Italia (Mathers et al., 2015); mentre il ceppo 45993 (pulsotipo A5) aveva un profilo simile ad un secondo clone ospedaliero (ST307) emerso dal 2014 (Brescini et al., 2019).

A questo punto si è proceduto alla costruzione di un dendrogramma con il BioNumerics software version 7.0 (Applied Maths Scientific Software Development, Sint-Martens-Latem, Belgium), il quale consiste nella rappresentazione grafica della corretta ripartizione gerarchica dei vari ceppi in clusters differenti in base alla loro distanza evolutiva.

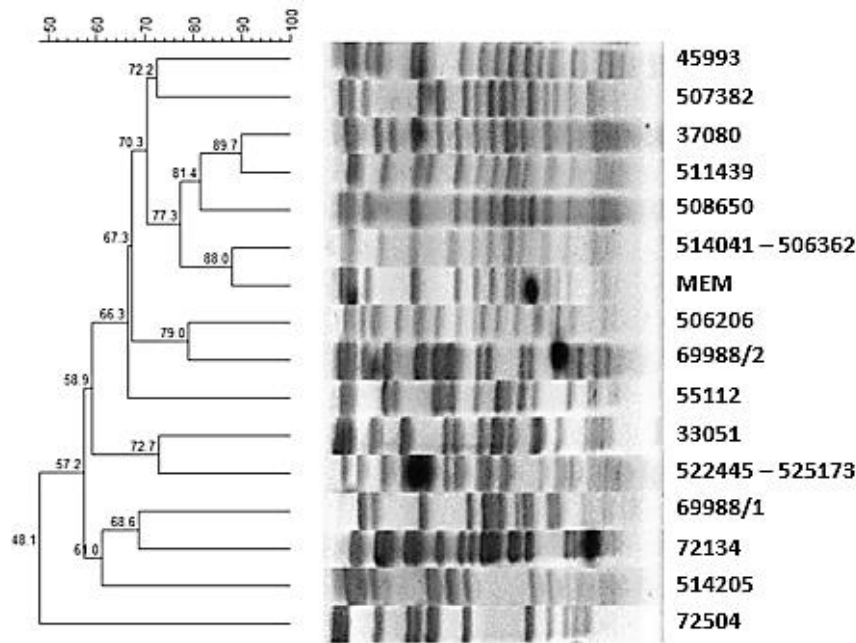


Figura 25 Analisi XbaI-PFGE mediante il software BioNumerics 7.0 (Applied Maths Scientific Software Development, Sint-Martens-Latem, Belgium). Analisi di cluster e costruzione del dendrogramma mediante UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Il dendrogramma mostrava lo stesso cluster ipotizzato in precedenza e metteva in evidenza il grado di correlazione filogenetica esistente tra tutti i ceppi in esame.

In un secondo momento i 5 isolati CPE positivi per *bla<sub>KPC</sub>* sono stati tipizzati mediante la tecnica di MLST (Tabella 23).

CEPPO	VARIANTI ALLELICHE							ST
	gapA	infB	Mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	
506362	4	1	2	52	1	1	7	ST307
507382	54	3	1	1	1	1	79	ST512
508650	4	1	2	52	1	1	7	ST307
511439	4	1	2	52	1	1	7	ST307
514041	4	1	2	52	1	1	7	ST307

Tabella 23 Profilo allelico dei ceppi produttori di carbapenemasi.

I risultati evidenziavano una predominanza di ST307 (n. 4 ceppi) rispetto ad un unico isolato ST512. Va sottolineato che i 4 ceppi ST307 erano risultati produttori di KPC-2, mentre il singolo ceppo ST512 presentava la variante allelica KPC-3. Questo risultato ha suggerito un incremento nella diffusione del nuovo clone virulento e MDR ST307 (Villa et al., 2017) rispetto al clone endemico ST512 (Brescini et al., 2019).

### 3.5 Analisi plasmidica

La PFGE preceduta dalla digestione enzimatica con la nucleasi S1 ha messo in evidenza il profilo plasmidico dei ceppi in esame, consentendo di stabilire il numero e la rispettiva dimensione molecolare approssimata.

CEPPO	N° PLASMIDI	DIMENSIONE (Kb)
72504	1	175
33051	2	90; 140
55112	3	110; 140; 150
72134	2	145; 220
69988/1	1	160
69988/2	2	50; 250
506206	4	50; 60; 75; 180
<b>506362</b>	1	260
MEM	-	-
506594	3	110; 140; 150
507382	1	120
37080	-	-
<b>508650</b>	3	120; 140; 150
<b>511439</b>	1	260
514205	-	-
<b>514041</b>	1	260
522445	3	100; 200; 230
525173	3	100; 200; 230
38042	-	-
45993	1	300

Tabella 24 Interpretazione della S1-PFGE.

Mediante analisi S1-PFGE 4 ceppi risultavano apparentemente privi di DNA plasmidico, mentre gli altri ceppi erano variabili per numero e dimensione dei plasmidi (Tabella 24).

Nel caso specifico degli isolati di *K. pneumoniae* contenenti il gene *bla<sub>KPC</sub>* è interessante notare che i 2 ceppi del clone principale (506362 e 514041), identici tra loro per fenotipo di resistenza, carbapenemasi prodotta (KPC-2), ST307 e pulsotipo A, presentavano un unico plasmide di 260 Kb (p260) ed un singolo plasmide di dimensioni identiche era stato evidenziato anche nel ceppo 511439 (ST307, KPC-2, pulsotipo A4). Il ceppo 507382 (ST512, KPC-3, pulsotipo I) presentava un unico plasmide di 120 Kb ed infine il ceppo 508650 (ST307, KPC-2, pulsotipo A3) era provvisto di 3 plasmidi di 120, 140 e 150 Kb.

### 3.6 Prove di trasferimento interspecifico di plasmidi contenenti il gene *bla<sub>KPC</sub>*

Tutti i ceppi KPC-produttori sono stati utilizzati come donatori nelle prove di trasferibilità tramite coniugazione; mentre il ceppo di *E. coli* J53<sup>AzR</sup> è stato impiegato come ricevente in tutti gli esperimenti di incrocio interspecifico.

Le colonie cresciute dai diversi incroci sono state inizialmente sottoposte a test di sensibilità agli antibiotici e test fenotipici per escludere la comparsa di mutanti resistenti. In base alle indagini preliminari soltanto l'incrocio 506362 x J53<sup>AzR</sup> aveva prodotto dei veri e propri transconiuganti; mentre tutti gli altri esperimenti avevano generato mutanti resistenti al sodio azide (Tabella 25).

INCROCIO	DONATORE	RICEVENTE	N° COLONIE	RISULTATO
506362 x J53	3,6 x 10 <sup>9</sup>	2,5 x 10 <sup>10</sup>	125	TRANSCONIUGANTI
507382 x J53	2,4 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>9</sup>	350	MUTANTI
508650 x J53	2 x 10 <sup>9</sup>	2,2 x 10 <sup>9</sup>	200	MUTANTI
511439 x J53	1 x 10 <sup>9</sup>	1,8 x 10 <sup>10</sup>	155	MUTANTI

Tabella 25 Risultati delle prove di coniugazione.

Di tutti i transconiuganti ottenuti dall'incrocio 506362 x J53<sup>AzR</sup>, 5 di essi scelti casualmente sono stati ulteriormente studiati non solo tramite i test fenotipici volti alla determinazione della loro sensibilità a numerose classi di antibiotici, ma anche tramite indagini molecolari volte alla ricerca dei geni di  $\beta$ -lattamasi ed eventuali altri geni di resistenza trasferiti e tramite genotipizzazione.

Per quanto riguarda il profilo di sensibilità/resistenza, i transconiuganti risultavano resistenti ai  $\beta$ -lattamici, compresi monobattami, cefalosporine a spettro esteso e cefalosporine di IV generazione (cefepime), non sensibili ad imipenem e meropenem e resistenti ad ertapenem (Tabella 26), suggerendo la trasmissione orizzontale di un elemento coniugativo contenente il gene *bla<sub>KPC</sub>*.

CEPPO	IPM	MEM	ETP	ATM	CAZ	CTX	FEP	CN	AK	CIP	SXT	COL	TGC	CHL	CZA
TC 506362 x J53	NS	NS	R	R	R	R	R	S	S	NS	S	S	S	S	S
506362	R	R	R	R	R	R	R	S	NS	R	R	S	R	S	S
J53 <sup>AzR</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabella 26 Profilo di sensibilità/resistenza alle varie classi di antibiotici.

Per di più, tutti i transconiuganti mostravano una non sensibilità alla ciprofloxacina rispetto al donatore che invece era pienamente resistente ai chinoloni e questo particolare fenotipo di sensibilità/resistenza a basso livello è stato confermato valutando la MIC mediante E-test: i transconiuganti avevano MIC range 0,5-0,75 µg/mL; mentre il donatore aveva MIC > 32 µg/mL. Tale risultato suggeriva il co-trasferimento di un gene in grado di conferire una bassa resistenza ai chinoloni, tra cui *aac(6')-Ib-cr*, una variante allelica che codifica per l'enzima aminoglicoside acetiltrasferasi ed inattiva anche norfloxacina e ciprofloxacina (Poirel et al., 2008). Quanto appena riportato non deve stupire in quanto il gene in questione è stato spesso trovato in associazione con altri geni di resistenza in plasmidi coniugativi che veicolano *bla<sub>KPC</sub>* (Villa et al., 2017).

Le successive indagini molecolari mediante amplificazione hanno confermato non solo il trasferimento nei transconiuganti del gene *bla<sub>KPC</sub>*, come atteso dai risultati di sensibilità, ma anche il co-trasferimento di altri 2 geni, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* ed hanno evidenziato la presenza del gene *aac(6')-Ib* sia nei transconiuganti che nel donatore.

Le analisi di XbaI-PFGE e S1-PFGE hanno consentito di valutare rispettivamente il profilo genomico e il contenuto plasmidico dei transconiuganti.

In particolare, le analisi di XbaI-PFGE rilevavano una totale uguaglianza nel profilo genomico di transconiuganti e ricevente; mentre le analisi di S1-PFGE evidenziavano la presenza nei transconiuganti di un plasmide delle stesse dimensioni del donatore (p260).

### ***3.7 Analisi molecolare dei plasmidi presenti in ceppi di K. pneumoniae KPC+***

In *K. pneumoniae* è stata documentata l'associazione tra ST e specifici plasmidi che mediano la diffusione della resistenza ai carbapenemi e più nello specifico tra ST258 e plasmidi pKpQIL-like e tra ST307 e plasmidi pKPN-3-like (García-Fernández et al., 2012).

Per caratterizzare i plasmidi dei 5 ceppi di *K. pneumoniae* KPC-produttori e distinguerli in base al loro gruppo di incompatibilità è stato utilizzato il PBRT 2.0 kit ed in tale indagine è stato incluso anche uno dei transconiuganti (TC/J53).

CEPPO	REPLICONI
506362	FIA; A/C; <b>FIIK</b> ; <b>FIB KN</b>
514041	FIA; A/C; FIIK; FIB KN
507382	FIA; L; I1 $\gamma$ ; A/C; FIIK; FIB KQ
508650	FIA; A/C; FIIK; FIB KQ; FIB KN
511439	FIA; A/C; FIIK; FIB KN
TC/J53	<b>FIIK</b> ; <b>FIB KN</b>

Tabella 27 Risultati del PBRT 2.0 kit.

Il replicone FIIK era comune a tutti i ceppi in esame; mentre il replicone FIA era presente in tutti gli isolati di *K. pneumoniae* KPC+ ed assente in TC/J53. Un risultato molto interessante era rappresentato dai repliconi che accomunano il ceppo 506362 e il TC/J53, vale a dire FIIK e FIB KN, che per altro sono gli unici repliconi presenti nel transconiugante tra tutti quelli considerati dal kit. In particolare, i 2 repliconi FIB KN e FIB KQ sono utili per identificare e distinguere, all'interno del gruppo di incompatibilità IncFIIK, i 2 plasmidi più comuni in *K. pneumoniae*: pKPN3-like (replicon FIB KN) e pKpQIL-like (replicon FIB KQ) ([García-Fernández et al., 2012](#)).



## 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

*K. pneumoniae* è un batterio Gram-negativo clinicamente molto rilevante in quanto si rende responsabile di molteplici infezioni nosocomiali anche piuttosto severe, quali polmoniti, infezioni del tratto urinario (UTIs), sepsi e meningiti (Magill et al., 2014). La sua importanza è andata aumentando in virtù della graduale emergenza e della rapida disseminazione a livello mondiale di ceppi produttori di carbapenemasi, i quali complicano ulteriormente la terapia delle infezioni di cui si rendono responsabili.

Le carbapenemasi sono ampiamente variabili per classe e spettro di attività antimicrobica e la loro espressione può conferire una resistenza ampiamente variabile oppure una ridotta sensibilità a tutti o quasi tutti i  $\beta$ -lattamici; di conseguenza, la maggior parte dei ceppi CPE ed in particolare gli isolati di *K. pneumoniae* risultano fenotipicamente MDR o XDR. I geni che codificano per tali enzimi, inoltre, sono associati con elementi genetici mobili che spesso risiedono su plasmidi coniugativi; pertanto possono essere facilmente trasmessi e diffusi tra ceppi diversi di una stessa specie così come tra specie batteriche diverse (Iovleva et al., 2017). In aggiunta al suo importante ruolo di patogeno, *K. pneumoniae* è stata identificata come un punto cruciale d'ingresso dei geni di resistenza all'interno dell'ordine *Enterobacterales*.

I dati di sorveglianza europei indicano un trend in aumento nella diffusione di CRE e soprattutto di *K. pneumoniae* in Europa (ECDC, 2018). La situazione è particolarmente preoccupante in Italia, dove a partire dal 2010 si è assistito alla rapida diffusione di ceppi CPE, la quale nel 2012 ha raggiunto un tasso di prevalenza del 30%, uno dei più alti valori mai registrati in Europa (Giani et al., 2017). Il fenomeno è prevalentemente dovuto alla disseminazione a livello nosocomiale di cloni internazionali di *K. pneumoniae* produttori di KPC e più in particolare degli isolati che appartengono al gruppo clonale ST258 (GC258) o al clone emergente ST307 (Villa et al., 2017), sebbene sporadicamente vengano segnalate altre specie batteriche producenti varianti di carbapenemasi diverse da KPC. Di conseguenza assume estrema urgenza la ricerca di strategie in grado di contrastare la diffusione di CRE, soprattutto nelle strutture ospedaliere, dove le infezioni sostenute da questi patogeni sono generalmente associate ad un elevato tasso di mortalità.

La resistenza ai carbapenemi è un fenomeno che coinvolge non solo l'ambiente clinico-ospedaliero, ma anche il settore agricolo ed urbano; tuttavia, nonostante i numerosi studi a riguardo, la mancanza di standardizzazione nel caratterizzare gli isolati può rendere difficile l'identificazione dei serbatoi primari e le dinamiche di trasmissione della resistenza.

Un primo obiettivo di questa tesi è stato studiare il grado di colonizzazione intestinale di CRE in un campione di popolazione. Successivamente l'attenzione si è concentrata sulla caratterizzazione di tutti gli isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi che hanno superato lo screening colturale di campioni fecali, nel quale si è utilizzato come criterio di selezione la resistenza o la non sensibilità ad almeno un carbapenemico. La produzione di carbapenemasi è stata evidenziata in 5 ceppi di *K. pneumoniae* dapprima mediante metodi fenotipici e successivamente mediante indagini molecolari, le quali hanno la positività per il gene *bla<sub>KPC</sub>* dimostrato in tutti e 5 i ceppi. La sequenza dei prodotti di amplificazione ha indicato che 4 isolati erano KPC-2 produttori e solo un ceppo aveva KPC-3. I 2 enzimi rappresentano le varianti più frequentemente riscontrate negli isolati di *K. pneumoniae* di tutto il mondo, sia in cloni epidemici diversi, sia in associazione con particolari elementi plasmidici. In Italia, la KPC-3 rappresenta tuttora la carbapenemasi di gran lunga più diffusa in Italia ed è associata con il CG258 (Giani et al., 2017).

L'analisi del resistoma della popolazione di *K. pneumoniae* in studio ha evidenziato che quasi la totalità dei ceppi erano da considerarsi da multi-resistenti ad estensivamente resistenti e che la metà dei ceppi erano resistenti a tutti i  $\beta$ -lattamici considerati, compresi i carbapenemi maggiormente utilizzati in terapia, imipenem e meropenem. Va anche sottolineata l'elevata percentuale di resistenza riscontrata per ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazolo (85%) e, oltre a valori di resistenza da non sottovalutare nei confronti di aminoglicosidi e cloramfenicolo, anche l'elevata percentuale di resistenza dimostrata per la tigeciclina (80%). L'unico antibiotico che ancora manteneva la piena attività antimicrobica era la colistina. Per finire, 2 isolati risultavano resistenti alla nuova combinazione ceftazidime/avibactam, la quale è stata sviluppata recentemente per la terapia di infezioni complicate sostenute da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi.

I risultati di tipizzazione molecolare mediante XbaI-PFGE hanno evidenziato la presenza di un cluster costituito da 7 ceppi con profili genomici da identici a probabilmente correlati e da numerosi altri pulsotipi non correlati con il cluster predominante.

Per di più, ben 4 ceppi KPC-produttori (tutti positivi per KPC-2) erano inclusi nel cluster e appartenevano al ST307. L'unico isolato con KPC-3 era assegnato al ST512, un *single-locus allelic variant* del clone pandemico internazionale ST258.

Sebbene il numero dei ceppi sia limitato, la proporzione ottenuta tra isolati ST307 e ST512 (4:1) da campioni fecali sembra suggerire un aumento della diffusione del ST307 nella nostra zona geografica. Un precedente lavoro retrospettivo condotto su 107 ceppi di *K. pneumoniae* isolati da emocolture aveva evidenziato la presenza endemica di ST512 (KPC-3 produttore e colistino-resistente) nell'ospedale Regionale di Torrette e la comparsa recente del nuovo clone ST307 (KPC-2 produttore e colistino-sensibile): il ceppo, isolato da un paziente proveniente da una struttura di lungadegenza, aveva determinato un mini-outbreak che aveva coinvolto diversi reparti ospedalieri (Brescini et al, 2019).

Il nostro risultato sembra confermare quanto riportato nel precedente lavoro, vale a dire la necessità di saper identificare tempestivamente i cloni emergenti esterni che possono rendersi responsabili di episodi epidemici e di diffusione nell'area ospedaliera. Combinando insieme i risultati dell'analisi plasmidica mediante S1-PFGE e la classificazione in gruppi di incompatibilità con una procedura standardizzata, 3 dei 5 ceppi KPC-produttori ST307 presentavano un singolo plasmide di grandi dimensioni (p260), mentre l'altro ceppo ST307 possedeva 3 plasmidi e l'unico isolato ST512 aveva un solo plasmide che, per dimensione molecolare (120 kb) ed altre caratteristiche analizzate, era molto simile ai plasmidi pKpQIL, i quali rappresentano i principali plasmidi responsabili della diffusione mondiale di KPC (García-Fernández et al., 2012).

Negli esperimenti di coniugazione interspecifici soltanto un incrocio ha dato esito positivo a partire da uno dei donatori ST307 e produttori di KPC-2 e l'analisi molecolare dei transconiuganti ha evidenziato la presenza di un singolo plasmide di 260 Kb identico al donatore ed il co-trasferimento dei geni *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *aac(6')-Ib*. Tra l'altro, la presenza del gene *aac(6')-Ib*, che conferisce basso livello di resistenza alla ciprofloxacina, è stata dedotta dall'analisi del fenotipo di resistenza dei transconiuganti e poi confermata a livello molecolare anche sul donatore.

Le indagini preliminari per la caratterizzazione del plasmide e la positività evidenziata per i repliconi FIIK e FIB KN suggeriscono che molto probabilmente il plasmide di 260 Kb presente nei trasnconiuganti appartiene al medesimo gruppo dei plasmidi di virulenza e resistenza pKPN-307 precedentemente riportati in letteratura (Villa et al., 2017).

Rimane da verificare se tutti i geni co-trasferiti ed in particolare *bla*<sub>KPC-2</sub> siano associati o meno sullo stesso plasmide ed analisi di PCR mapping e sequenziamento sono da auspicare in quanto nessun plasmide pKPN-307-like al momento veicola *bla*<sub>KPC</sub> (Villa et al., 2017).

Nonostante lo studio si sia concentrato maggiormente sui ceppi produttori di carbapenemasi, sulle loro caratteristiche genetiche ed epidemiologiche e sulla trasferibilità del gene *bla*<sub>KPC</sub>, un importante risultato della ricerca è emerso analizzando il resistoma dei ceppi di *K. pneumoniae*. Come descritto sopra, la maggior parte dei ceppi ottenuti dallo screening dei campioni fecali sono risultati resistenti ai carbapenemi (CRE) per meccanismi diversi dalla produzione di carbapenemasi, sebbene tali meccanismi non siano stati indagati. I nostri risultati hanno evidenziato una proporzione diversa tra ceppi CRE e CPE e suggeriscono la possibile sottostima dell'attuale prevalenza dei primi rispetto ai secondi, almeno a livello di colonizzazione intestinale della popolazione esaminata.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- **Ambler RP, 1980.** “The structure of  $\beta$ -lactamases”. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; May 198’; 289 (1036): 321-331. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.
- **Brescini L, Morroni G, Valeriani C, Castelletti S, Mingoia M, Simoni S, Masucci A, Montalti R, Vivarelli M, Giacometti A, Barchiesi F, 2019.** “Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy”. *BMC Infect Dis*, Jul 2019 ;19(1):611. DOI: 10.1186/s12879-019-4268-9.
- **Bush K, 2018.** “Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases”. *Antimicrob Agents Chemother*; Set 2018; 62 (10). pii: e01076-18. DOI: 10.1128 / AAC.01076-18.
- **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ, 2015.** “Identification of plasmids by PCR-based replicon typing”. *J Microbiol Methods*; 303:219-228. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013.** “Vital Signs: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae”. *Centers for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report*. 62: 165-170.
- **Conte V, Monaco M, Giani T, D’Ancona F, Moro ML, Arena F, D’Andrea MM, Rossolini GM, Pantosti A, 2016.** “Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage”. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 3386–3391. DOI: 10.1093/jac/dkw337.
- **Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimonth P, Brisse S, 2005.** “Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates”. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Aug 2005, 43: 4178–4182, No. 8. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4178–4182.2005.
- **Doi J, Paterson DL, 2015.** “Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*”. *Semin Respir Crit Care Med*; Feb 2015; 36 (1): 74–84. DOI: 10.1055/s-0035-1544208.
- **ECDC, 2018.** “Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe”. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>.

- **EUCAST, 2019.** “Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing – Version 7.0” (www.eucast.org).
- **EUCAST, 2019.** “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters – Version 9.0” (www.eucast.org).
- **Friedlaender C, 1882.** “About the Schizomycetes in Acute Fibrous Pneumoniae”. Archiv Patholog Anat Physiol Klinische Med; 87, 319-324. DOI: 10:1007/BF01880516.
- **Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, Mauri C, Nicchi J, Arena F, Nucleo E, Bracco S, Pantosti A; AMCLI-CoSA survey participants, Luzzaro F, Pagani L, Rossolini GM, 2017.** “Evolving  $\beta$ -lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients”. Euro Surveill. Aug 2017; 22(31). pii: 30583. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30583.
- **Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R, the AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti A, Pagani L, Luzzaro F, Rossolini GM, 2013.** “Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011”. Euro Surveillance; May 2013; 18(22). pii: 20489.
- **García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A, 2009.** “Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*”. J Antimicrob Chemother; 63: 274-281. DOI: 10.1093/jac/dkn470.
- **García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A, 2012.** “*Klebsiella pneumoniae* ST258 Producing KPC-3 Identified in Italy Carries Novel Plasmids and OmpK36/OmpK35 Porin Variants”. American Society for Microbiology Journal, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dec 2012; 56 (4): DOI: 10.1128/AAC.05308-11.
- **Girlich D, Poirel L, Nordmann P, 2012.** “Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*”. Journal of Clinical Microbiology, Feb 2012; 50 (2): 477-479. DOI: 10.1128 / JCM.05247-11.

- **Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević A, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL, the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group, 2016.** “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*; Dec 2017; 17 (2): 153–63. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30257-2.
- **Hunter S, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duynne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E, 2005.** “Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard”. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar 2005, 43:1045–1050, No. 3. DOI: 10.1128/JCM.43.3.1045–1050.2005.
- **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL, 2012.** “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance”. *Clinical Microbiology Infection*, Apr 2012; 18: 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.
- **Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, 2014.** “Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections”. *N Engl J Med* 370:1198-1208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801.
- **Martin RM, Bachman MA, 2018.** “Colonization, Infection and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*”. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004.
- **Mathers AJ, Peirano G, Pitoutb JDD, 2015.** “The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International HighRisk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*”. *Clin Microbiol*; Jul 2015; 28(3):565-91. DOI: 10.1128/CMR.00116 -14.

- **Nordmann P, Poirel L, 2014.** “The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide”. *Clinical Microbiology Infection*, Set 2014; 20 (9): 821–830. DOI: 10.1111/1469-0691.12719.
- **O’Neill Jim, 2014.** “Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations”. *Antimicrobial Resistance*.
- **Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB, Jenkins SG, Limbago BM, Das S, 2017.** “Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae”. Aug 2017; 55 (8): 2321-2333. DOI: 10.1128 / JCM.00193-17.
- **Podshun R, Ulmann U, 1998.** “*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors”. *Clin Microbiol*; 11:598-603.
- **Poirel L, Cattori V, Nordmann P, 2008.** “Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?”. *Clinical Microbiology Infection*, Apr 2008, 14(4):295-7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01930.x.
- **Poirel L, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P, 2011.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Mag. 2011; 70 (1): 119-123. DOI: 10.1016/.2010.12.002.
- **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, 1995.** “Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing”. *J Clin Microbiol*; Sep 1995; 33(9):2233-9.
- **Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, Edimiani A, Mammina C, Ocampo AM, Jimenez JN, Doumith M, Woodford N, Hopkins K, Carattoli A, 2017.** “Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPCproducing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone”. 2017;3. DOI: 10.1099/mgen.0.000110.
- **Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A, 2010.** “Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants”. *J Antimicrob Chemother*; 65:2518-2529. DOI: 10.1093/jac/dkq347.



- **World Health Organization, 2015.** “Global Action Plan on Antimicrobial Resistance”.
- **World Health Organization, 2017.** “Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics”.
- **Wright H, Bonomo RA, Paterson DL, 2017.** “New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn?”. *Clinical Microbiology Infection*; Oct 2017; 23(10):704-12. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.09.001.

## Ringraziamenti

Questo spazio lo dedico a tutti coloro che in qualche modo mi sono stati vicino e mi hanno saputo sostenere in un percorso di studi estremamente interessante e stimolante, soprattutto per chi come me è un vero amante della ricerca, nonostante purtroppo la realtà lavorativa sia parecchio limitata e difficoltosa. La mia passione è nata tanto tempo fa, quando un tumore si è portato via nonno che io ero ancora una bambina e da allora mi sono convinta di poter provare a fare qualcosa per gli altri e per me stessa ed in questi anni non ho mai pensato nemmeno per un attimo di abbandonare tutto ed intraprendere una strada forse più semplice perché credo che nessun altro percorso mi avrebbe saputo rendere così tanto appagata e privilegiata nell'aver potuto scoprire ed approfondire un mondo così misterioso e allo stesso tempo davvero affascinante.

Per prima cosa vorrei ringraziare i miei genitori, Sauro e Fabiola, che mi hanno permesso di studiare e, nonostante non fossero del tutto convinti della mia scelta, non me lo hanno mai fatto pesare e mi sono stati vicini con tutto l'amore e il sostegno che solo una madre e un padre sanno donare. Un grazie speciale va poi ai miei fratelli, Francesco e Silvia, che hanno saputo spronarmi nei momenti di difficoltà e mi hanno sempre incoraggiata e supportata non solo in questo percorso, ma anche nella vita. Un ringraziamento enorme va alla mia correlatrice, Marina Mingoia, che ritengo sia stata il migliore mentore che mi potesse capitare, infinitamente disponibile e sempre pronta a chiarire qualsiasi dubbio o perplessità, arricchendo enormemente il mio bagaglio culturale e stimolando il mio infinito amore per la ricerca. Un sentito grazie va anche alla mia correlatrice, Gloria Magi, che mi è stata vicino e mi ha pazientemente insegnato le varie tecniche di laboratorio e mi ha saputo dare dei validi consigli. Vorrei poi ringraziare i nonni, gli zii, i cugini e gli amici, sia quelli che ci sono da una vita che quelli nuovi, ma non meno preziosi, tra cui soprattutto Federica, una compagna di corso speciale con cui ho condiviso giornate di studio infinite, gioie e sconfitte della realtà universitaria, nonché momenti di felicità, complicità e confidenza.

Per finire vorrei ringraziare e fare un grande augurio a me stessa, quello di non perdere la determinazione e la smodata passione per la ricerca e di non farmi mai abbattere dalle numerose sconfitte che la realtà lavorativa potrebbe portare con sé, d'altronde *“per aspera, ad astra”* ossia *“attraverso le difficoltà si giunge alle stelle”*.