UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Sepsi da Klebsiella pneumoniae KPC: caratterizzazione genotipica ed epidemiologica dei ceppi clinici marchigiani

Klebsiella pneumoniae KPC sepsis: genotypic and epidemiological characterization of clinical strains from the Marche region

Tesi di Laurea Magistrale di: Relatore:

D'Achille Gloria Dott. Morroni Gianluca

Anno accademico 2019/2020

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1. Klebsiella pneumoniae 3

1.1.1. Fattori di virulenza 4

1.1.2. Resistenza ai carbapenemi 6

1.1.3. Classificazione delle carbapenemasi 10

1.1.3.1. Carbapenemasi di classe B 12

1.1.3.2. Carbapenemasi di classe D 13

1.1.3.3. Carbapenemasi di classe A 14

1.1.3.3.1. KPC 15

1.1.3.3.2. K. pneumoniae-KPC in Italia 18

1.1.4. Opzioni terapeutiche 20

1.1.4.1. Colistina 21

1.1.4.2. Ceftazidima-avibactam 23

2. MATERIALI E METODI 27

2.1. Ceppi batterici 27

2.2. Antibiotici 27

2.3. Test di sensibilità 27

2.4. Estrazione del DNA totale 28

2.4.1. Qubit 4 30

2.4.2. Elettroforesi 31

2.5. Saggi di amplificazione 32

2.6. Tipizzazione 33

2.6.1. PFGE 34

2.6.2. MLST 36

2.7. Sequenziamento ed analisi di sequenza 36

2.7.1. Flow cell 37

2.7.2. Rapid Sequencing kit 39

2.7.3. Rapid Barcoding Sequencing 42

2.7.4. Analisi di sequenza 44

3. RISULTATI 45

3.1. Determinazione delle MIC 45

3.1.1. Resistenza alla colistina per aree geografiche 48

3.1.2. Resistenza alla colistina tra il 2014 ed il 2019 48

3.2. Saggi di amplificazione 51

3.3. Tipizzazione 51

3.3.1. Distribuzione del pulsotipo G1 negli anni e nelle zone di studio 55

3.4. Sequenziamento ed analisi di sequenza 56

3.4.1. K. pneumoniae 533863 57

3.4.1.1. PlasmidFinder 58

3.4.1.2. BLAST 59

3.4.1.3. ResFinder 60

3.4.1.4. MLST 63

3.4.1.5. VirulenceFinder 64

3.4.2. K. pneumoniae PS-24 65

3.4.2.1. PlasmidFinder 65

3.4.2.2. BLAST 66

3.4.2.3. ResFinder 67

3.4.2.4. MLST 71

3.4.2.5. VirulenceFinder 72

4. DISCUSSIONE 73

5. BIBLIOGRAFIA 82

1. INTRODUZIONE

La comparsa incessante di nuove antibiotico-resistenze in numerose specie batteriche rappresenta un'emergenza sanitaria globale estremamente importante. La causa di questa rapida diffusione è da ricercare, oltre che in meccanismi di resistenza intrinseci ad alcuni ceppi, nello smodato uso di antibiotici sia in ambito clinico che industriale. Questo ha portato alla comparsa di batteri detti '*superbugs'* o MDR (*multi drug resistant*), indicati dal ECDC[1], in accordo con i breakpoints di EUCAST[2] e FDA[3], come ceppi caratterizzati da insensibilità acquisita verso almeno un farmaco di tre diverse categorie di agenti antimicrobici (*Magiorakos et al., 2011*). Uno studio condotto dal ECDC stima che i costi associati alle infezioni causate da batteri MDR raggiungano i 20 miliardi di dollari annui solo negli Stati Uniti, a cui si vanno a sommare ulteriori 35 miliardi per perdita di produttività *(Van Duin and Doi, 2017).*

Nel 2017 la *World Health Organisation* (WHO) ha pubblicato una lista delle 12 specie batteriche per le quali la necessità di sviluppare nuovi antibiotici è prioritaria, dividendoli in tre classi di importanza: critica, alta e media. Nel primo gruppo ritroviamo *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, microrganismi accomunati dalla

[1] European Centre for Disease Prevention and Control
[2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
[3] United States Food and Drug Administration

resistenza ai carbapenemi (*Havenga et al., 2019*). Stando ai dati dell'EARS-NET[4], nel nostro paese l'incidenza di questi ceppi MDR in isolati clinici raccolti tra il 2015 ed il 2019, è aumentata in maniera considerevole [Figura 1]. Negli ultimi anni è stata prestata particolare attenzione alla famiglia delle *Enterobacteriaceae,* di cui fa parte *Klebsiella spp.*, in quanto responsabile di numerose infezioni sia in ambito comunitario che ospedaliero. La pericolosità di questi batteri risiede soprattutto nella resistenza ai carbapenemi, che conferisce morbidità e mortalità maggiori rispetto ai ceppi sensibili. Questi ceppi, definiti CRE[5] dal CDC[6], dal 2015 includono tutte le *Enterobacteriaceae* resistenti a qualsiasi antimicrobico carbapenemico e capaci di sintetizzare carbapenemasi (*Van Duin and Doi, 2017).* Le carbapenemasi, infatti, rappresentano il principale meccanismo di resistenza messo in atto dai ceppi CRE che, ad oggi, hanno raggiunto un'estensione globale.

Esistono differenti tipi di carbapenemasi, con peculiari caratteristiche, composizione e distribuzione geografica. Le più rappresentate sono KPC[7], VIM[8], NDM[9] e OXA-48[10], di cui la prima è diventata endemica in Italia (*Conte et al., 2016*).

[4] Annual Report of European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
[5] Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*
[6] Centers for Desease Control and Prevention
[7] Klebsiella pneumoniae carbapenemase
[8] Verona integron-encoded metallo-β-lactamases
[9] New-Dehli-metallo- β-lactamases
[10] Oxacillinase-48-like β-lactamases

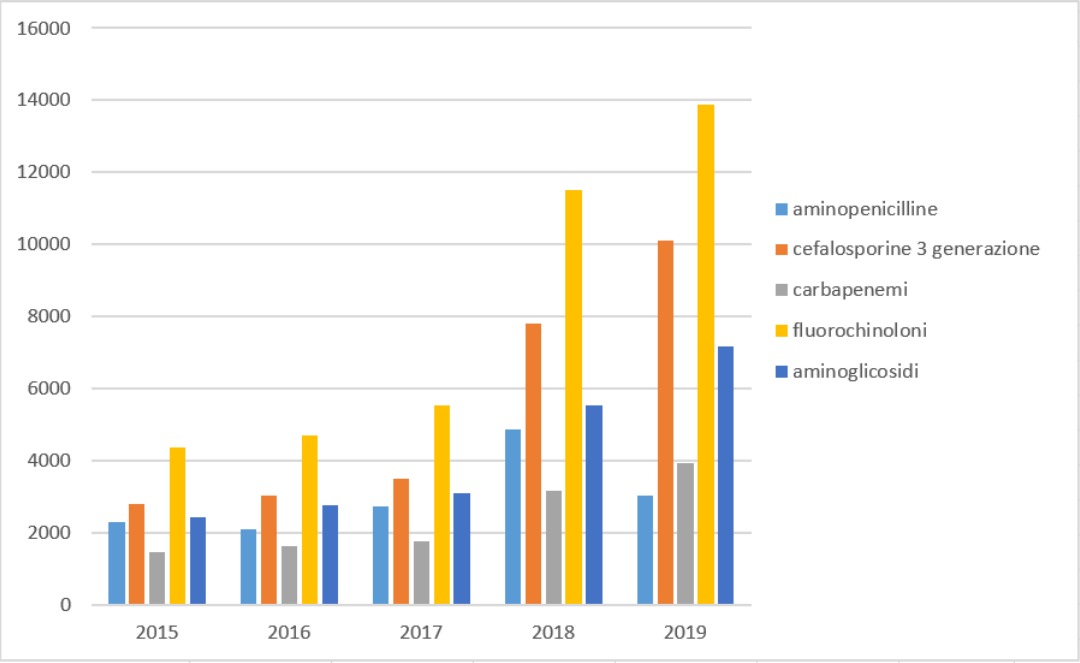


***Figura 1**. Trend dei fenotipi resistenti di A. baumannii, P. aeruginosa, E. coli e K. pneumoniae in isolati clinici riscontrati in Italia tra il 2015 e il 2019 (EARS-Net).*

1.1. Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae è un batterio ambientale, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae,* isolato per la prima volta da Carl Friedlander nel 1882 da polmoni di soggetti deceduti per polmonite. È un bastoncello Gram negativo capsulato, immobile, catalasi positivo, ossidasi negativo e anaerobio facoltativo [Figura 2].

Generalmente lo ritroviamo come commensale delle mucose respiratorie e del tratto intestinale umano ma, in condizioni favorevoli riscontrabili in soggetti immunocompromessi o in pazienti ospedalizzati, può comportarsi da patogeno opportunista rendendosi responsabile di infezioni respiratorie ed urinarie ma anche di setticemie. Queste infezioni, in molti casi, risultano estremamente

complicate da trattare poiché sostenute da ceppi resistenti a svariati antibiotici: di conseguenza, il fallimento terapeutico consente una disseminazione sistemica a questo patogeno.

Figura 2**. Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di Klebsiella pneumoniae.* ***Fonte: *https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/klebsiella/pneumoniae*

1.1.1. Fattori di virulenza

Negli ultimi dieci anni, l'incremento dell'attività di ricerca sulla patogenesi di *K. pneumoniae* a livello del tratto urinario, ha dimostrato che la sua infettività è strettamente influenzata da svariati fattori di virulenza. Molto importante è la produzione di un'abbondante capsula polisaccaridica estremamente viscosa, in grado di inibire e danneggiare, con maggiore o minore efficienza in base alla sua composizione, i fagociti della cellula ospite [Figura 3]. In questo modo il

batterio riesce a sfuggire ai meccanismi di difesa dell'ospite e a sopravvivere più a lungo al suo interno (*Clegg and Murphy, 2016*).

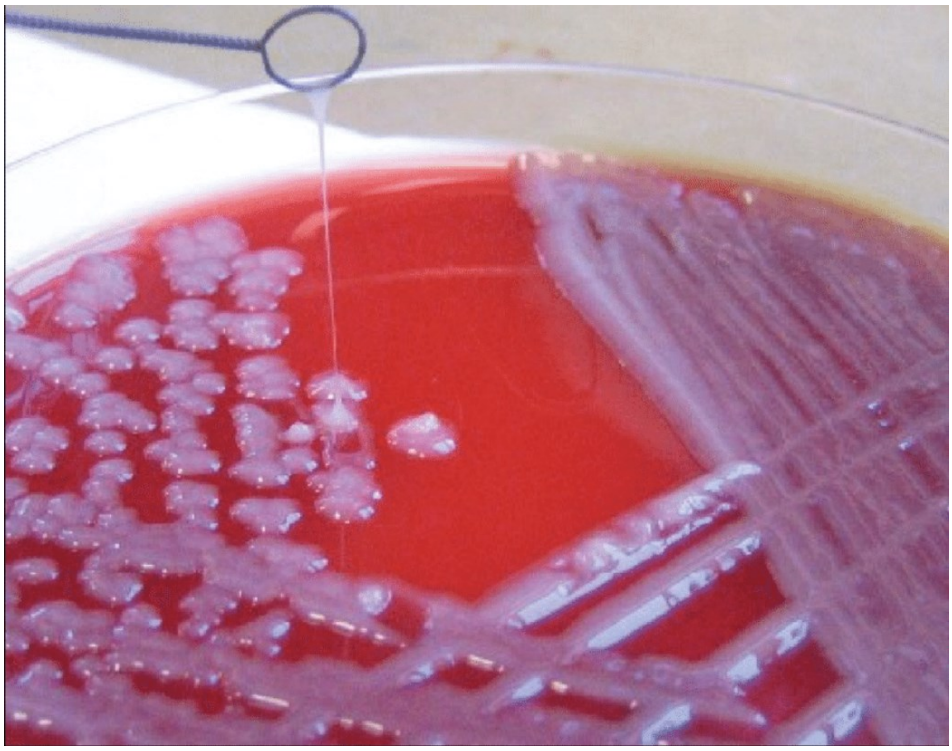


***Figura 3**. Colonie di Klebsiella pneuomoniae caratterizzate da elevata mucosità dovuta all'abbondante produzione di capsula polisaccaridica.*

Un'altra caratteristica molto importante di questi batteri è la capacità di produrre biofilm[11] grazie alla presenza di fattori di adesione, come le adesine fimbriali di tipo III. Queste facilitano il legame sia con proteine della matrice extracellulare che con cellule del tratto urinario dell'ospite. Inoltre, permettono di colonizzare superfici biotiche e non, come ad esempio i cateteri urinari frequentemente utilizzati da pazienti ospedalizzati. Proprio per questo motivo *K. pneumoniae* risulta essere uno dei principali Gram negativi responsabili di

[11] Complessa aggregazione di microrganismi produttori di una matrice adesiva su supporti biotici e non

UTIs[12] e CAUTIs[13] (*Clegg and Murphy, 2016*) [Tabella 1]. È molto importante sottolineare che anche fattori dell'ospite incidono sullo sviluppo e sul decorso dell'infezione. Tra questi troviamo patologie come il diabete mellito, insufficienza renale cronica e ostruzione del tratto urinario.

***Tabella 1**. Percentuali di differenti tipi di UTIs determinate da K. pneumoniae. **Fonte**: microbiolspec February 2016 vol. 4 no. 1 doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012*

UTI type	**Occurence**
ICU-acquired UTIs	4%
Community-acquired UTI w/ catheter	8%
Nosocomial catheter associated UTI	10% to 11%
Community-acquired UTI	8,7% to 16,9%

1.1.2. Resistenza ai carbapenemi

Oltre ai fattori di virulenza, la pericolosità di *K. pneumoniae* risiede nella sua capacità di acquisire resistenze a svariate classi di antibiotici. Richiede particolare attenzione quella verso i carbapenemi, descritta per la prima volta negli Stati Uniti nel 1997 e poi in maniera sporadica nei tre anni successivi (*Clegg and Murphy, 2016*). Oggi ha raggiunto una diffusione a livello globale e, stando ai dati del report annuale dell'EARS, la situazione risulta estremamente preoccupante: l'incidenza di ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi dal 2006 al 2019 è aumentata di 7 volte rispetto agli anni

[12] Urinary tract infections
[13] Catheter-associated urinary-tract infections

precedenti (*EARS report 2019*) [Figura 4]. Si stima che la percentuale di resistenza a questo farmaco ammonti al 6,1% e sia concentrata soprattutto in paesi come Italia, Grecia e Romania (*Brescini et al., 2019*).

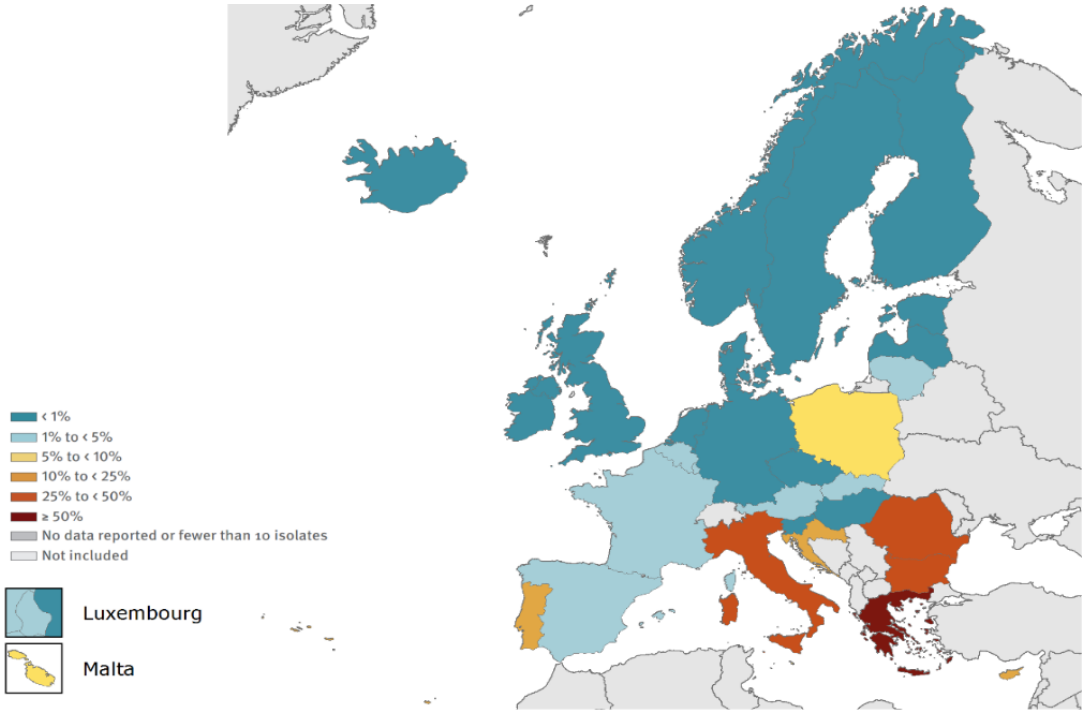


***Figura 4**. Incidenza di K. pneumoniae resistente ai carbapenemi in base alle diverse aree geografiche. **Fonte**: EARS-Net report 2019.*

La rapida diffusione di differenti fenotipi di resistenza anche tra ceppi diversi è stata resa possibile dalla localizzazione prevalentemente plasmidica dei determinanti di resistenza. Questi, grazie a meccanismi di trasferimento genico orizzontale, si sono spostati da *E. coli* a *K. pneumoniae* a livello del tratto gastrointestinale dell'ospite (*Clegg and Murphy, 2016)*. Facendo riferimento a pazienti ospedalizzati, il concetto risulta più lineare: infatti, questi soggetti spesso presentano una colonizzazione gastrointestinale da parte di *K.*

pneumoniae che, in questo modo, può interagire con la flora microbica locale di cui *E. coli* è un principale costituente.

I carbapenemi sono una classe di antibiotici β-lattamici ad ampio spettro d'azione, attivi contro una vasta gamma di batteri Gram positivi e negativi, sia aerobi che no. Questa categoria di farmaci agisce a livello della parete microbica, inibendo la sintesi dei legami crociati tra le catene lineari di peptidoglicano e, di conseguenza, causando lisi cellulare. La loro struttura è molto simile a quella delle penicilline, infatti presentano un anello β-lattamico ma, al posto dell'atomo di azoto legato al carbonio in posizione 1 è presente un altro atomo di carbonio, e a livello dell'anello tiazolidinico manca un atomo di zolfo ed è inserito un legame π [Figura 5].

Per la sintesi dei carbapenemi ci si è ispirati alla struttura della tienamicina prodotta da *Streptomyces cattleya*, un microrganismo del suolo. Infatti, carbapenemi e acido olivanico sono due dei più potenti β-lattamici naturalmente presenti in natura. Ci si aspettava, quindi, che molecole in grado di degradare questi β-lattamici venissero sintetizzate da organismi ambientali quali *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis* per proteggere l'integrità della loro parete cellulare e, di conseguenza, aumentare la loro fitness (*Bush, 2018*).

Con l'affermarsi delle specie CRE e quindi con la produzione di carbapenemasi, invece, la loro azione è stata neutralizzata generando la

necessità di sviluppare agenti terapeutici alternativi per il trattamento di infezioni sostenute da ESBL-E[14]. Un fatto ancora più allarmante è che questi ceppi CRE, negli ultimi tempi, si stanno spostando dall'ambiente ospedaliero a quello comunitario dove sono stati registrati i primi casi di infezione (*Van Duin and Doi, 2017).*

Appartengono alla classe dei carbapenemi farmaci come Imipenem, Ertapenem e Meropenem.

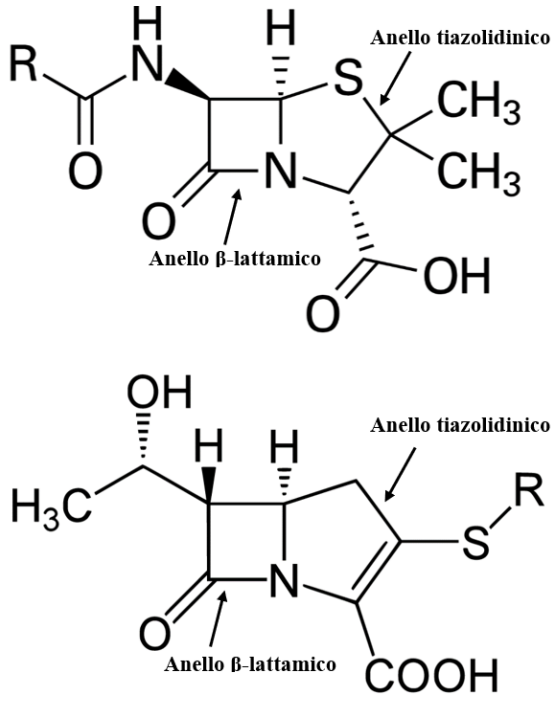


***Figura 5**. Struttura chimica di Penicillina e Carbapeneme a confronto.*

[14] Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae

1.1.3. Classificazione delle carbapenemasi

Le carbapenemasi sono enzimi appartenenti alla classe delle β-lattamasi, in grado di inibire la maggior parte degli antibiotici β-lattamici, inclusi i carbapenemi. Negli anni '90 si pensava che le carbapenemasi fossero specie-specifiche ed esclusivamente a codificazione cromosomica ma, la successiva scoperta di geni a localizzazione plasmidica, ha reso il quadro epidemiologico molto più complesso, portando questi enzimi ad una diffusione globale. In particolare, si sono distribuiti in svariati batteri Gram negativi multi-resistenti tra i quali spiccano le specie EPA[15] (*Diene and Rolain, 2014*).

Le β-lattamasi sono enzimi molto antichi, le cui origini sono datate milioni di anni fa e che, con ogni probabilità, derivano dalle PBPs[16] in quanto condividono un'elevata omologia di sequenza. Oggi sono conosciuti più di 2800 diversi tipi di cui, quelli che ricoprono maggiore interesse da un punto di vista clinico ed epidemiologico, sono le extended spectrum β-lattamasi (ESBLs) e le carbapenemasi (*Bush, 2019*).

Le carbapenemasi risultano insensibili all'azione della maggior parte degli inibitori delle β-lattamasi attualmente in commercio e sono in grado di riconoscere quasi tutti i tipi di anelli β-lattamici idrolizzabili [Figura 6]. Infatti,

[15] *Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, A. baumannii*
[16] Penicillin-binding proteins

sono attive nei confronti di penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi. Inoltre, spesso, sono associate ad altri determinanti di resistenza verso antibiotici come fluorochinoloni[17] e aminoglicosidi[18] (*Van Duin and Doi, 2017).*

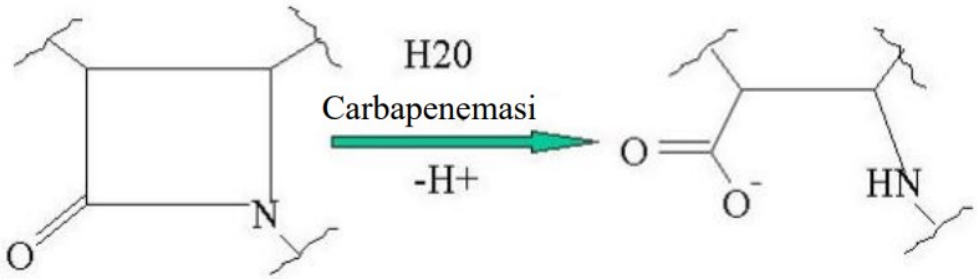


***Figura 6**. Meccanismo di azione delle carbapenemasi: idrolisi del legame amidico dell'anello β-lattamico.*

La classificazione delle β-lattamasi inizialmente era definita funzionale e, quindi, effettuava una discriminazione a seconda del profilo di substrati ed inibitori utilizzati. Successivamente si è passati ad un raggruppamento in base alla sequenza aminoacidica, dividendo gli enzimi in quattro classi: A, B, C, e D. Infine, il metodo più recente, prevede di combinare i sistemi biochimici e molecolari ottenendo 17 gruppi funzionali (*Bush, 2019*) [Tabella 2].

[17] Battericidi di origine sintetica che inibiscono la sintesi degli acidi nucleici interferendo con la DNA girasi
[18] Battericidi di origine naturale che inibiscono la sintesi proteica legando la subunità minore del ribosoma

Le carbapenemasi appartenenti alle β-lattamasi di classe A e D sono accomunate dalla presenza di una serina a livello del sito attivo mentre, quelle di classe B, da uno o più atomi di zinco (*Diene and Rolain, 2014*).

***Tabella 2**. Profilo dei substrati e degli inibitori delle carbapenemasi. Il simbolo '+' indica idrolisi/inibizione; il simbolo '-' assenza di idrolisi/inibizione; il simbolo '±' idrolisi/inibizione variabile.*

Molecular class	Functional group	Enzyme	Hydrolysis profile					Inibition profile	
			Penicillins	Early cephalosporins	Extended- spectrum cephalosporins	Aztreonam	Carbapenems	EDTA	Clavulanic acid
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
		NDM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

1.1.3.1. Carbapenemasi di classe B

Le carbapenemasi di classe B sono definite metallo β-lattamasi (MBL) e caratterizzate da uno o più atomi di zinco nel sito attivo. Non vengono inattivate dagli inibitori delle β-lattamasi ma dall' EDTA[19]. Inoltre, non sono in grado di idrolizzare l'aztreonam[20]. Appartengono a questa classe svariati enzimi (IMP[21], VIM[22], GIM[23], SIM[24] e NDM[25]) a localizzazione plasmidica, riscontrati

[19] Acido etilendiamminotetraacetico; è un agente chelante
[20] Antibiotico β-lattamico appartenente alla sottoclasse dei monobattami
[21] Imipenemase
[22] Verona integron-encoded β-lactamase
[23] German-imipenemase
[24] Seul imipenemase
[25] New Delhi metallo β-lactamase

prevalentemente nelle *Enterobacteriaceae* ma anche in *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (*Diane and Rolain, 2014*).

IMP è stata la prima ad essere individuata, nel 1991, in un isolato di *Serratia marcescens* in Giappone, ma oggi è diffusa in tutto il mondo. VIM, individuata per la prima volta in *P. aeruginosa* nel 1997 a Verona, oggi presenta più di 30 varianti ed il suo gene è localizzato in un integrone di classe 1 vicino al gene *aacA4* per la resistenza agli aminoglicosidi.

Le NDM sono le ultime metallo carbapenemasi scoperte, in quanto la prima identificazione risale ad agosto 2010, ma oggi sono i metallo-enzimi di resistenza ai carbapenemici più diffusi in *Enterobacteriaceae* e *A. baumannii* e, con le loro dieci varianti, mostrano un'estensione globale (*Diane and Rolain, 2014*).

1.1.3.2. Carbapenemasi di classe D

Le carbapenemasi di classe D vengono definite *oxa* β-lattamasi perché in grado di idrolizzare le oxacilline[26]. Presentano una serina nel sito attivo e vengono inattivate dagli inibitori delle β-lattamasi. I loro geni possono avere una localizzazione sia cromosomica che plasmidica e, quelli più frequentemente riscontrati in *A. baumannii,* sono bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} e bla_{OXA-58} mentre bla_{OXA-}

[26] antibiotico beta-lattamico a spettro limitato della classe delle penicilline

48 è caratteristico di *K. pneumoniae*. Il primo isolamento in Europa di quest'ultimo gene è avvenuto nel 2001 in Turchia, dove il ceppo è rimasto endemico causando gravi infezioni nosocomiali (*Van Duin and Doi, 2017*).

1.1.3.3. Carbapenemasi di classe A

Le carbapenemasi di classe A sono caratterizzate, come quelle di classe D, dalla presenza di una serina nel sito attivo ed è possibile neutralizzare la loro azione grazie ad inibitori delle β-lattamasi come acido clavulanico e tazobactam. Appartengono a questo gruppo gli enzimi IMI/NMC[27], SME[28], KPC e GES[29] che conferiscono resistenza ai β-lattamici a vari livelli: da ridotta suscettibilità a piena resistenza.

I primi tre enzimi sono codificati da geni cromosomici e, di conseguenza, sono meno diffusi a livello globale e più rari da identificare. In particolare, SME è la prima carbapenemasi ad essere stata individuata nel 1990 in un isolato clinico di *Serratia marcescens* ed è sempre rimasta legata a questo batterio. IMI e NMC, invece, sono associate a *Enterobacter cloacae*. Al contrario, KPC e GES sono a codificazione plasmidica e quindi la loro distribuzione sia geografica che tra le diverse specie, è molto più estesa. KPC è caratteristica delle specie *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, con prevalenza in *K.*

[27] Imipenem-hydrolyzing β-lactamase/ Not metalloenzyme carbapenemase
[28] Serratia marcescens enzyme
[29] Guiana extended spectrum

pneumoniae, così come ritroviamo in queste stesse specie i geni per l'espressione di GES localizzati su integroni plasmidici (*Diene and Rolain, 2014).* Nel 2000, quando GES è stata individuata per la prima volta in Grecia, è stata classificata come ESBLs perché in grado di idrolizzare penicilline e cefalosporine a spettro esteso ma, nel 2001, successivamente allo sviluppo di varianti con bassa ma misurabile attività nei confronti di imipenem, è stata inclusa nelle carbapenemasi di classe A (*Queenan and Bush, 2007*).

1.1.3.3.1. KPC

KPC è la serino-carbapenemasi più descritta (con 379 pubblicazioni) e diffusa nelle *Enterobacteriaceae* a partire dal 2001, quando è stata isolata per la prima volta negli Stati Uniti da un campione di *K. pneumoniae*. Da quel momento in poi, ceppi produttori di KPC sono stati individuati in tutto il mondo. I geni codificanti per questo enzima, infatti, hanno raggiunto un'estensione globale grazie alla loro localizzazione non cromosomica. In particolare, il primo gene, relativo alla KPC-1, è stato isolato da un grosso plasmide ma, poco tempo dopo, è comparsa una variante, denominata KPC-2, che differisce per un singolo aminoacido ed è localizzata a livello del trasposone[30] Tn4401 [Figura 7]. Ad oggi, il gene bla_{KPC-2} è quello più frequentemente riscontrato ed è caratteristico

[30] Elemento genetico trasponibile

del clone maggiormente diffuso: *K. pneumoniae ST-258*[31], considerato un clone internazionale ad alto rischio, allo stesso modo di *E. coli ST-131*[32].

È stata rilevata una stretta associazione tra specifici geni bla_{KPC} e due cladi di ST-258. Il clade I, indicato con ST-258A, è strettamente associato al gene bla_{KPC-2}, mentre il clade II, detto ST258B al bla_{KPC-3}. Questo indica che eventi di ricombinazione e di trasferimento di elementi genetici mobili ha portato ad una stretta associazione tra geni e cloni, rimasta intatta anche a seguito della diffusione del ceppo batterico da un individuo ad un altro (*Van Duin and Doi, 2017*). Questi due cladi differiscono per una regione di 215 kb dove risiede il cluster genico per la sintesi della capsula polisaccaridica. In particolare, ST-258A presenta il cluster cps-1 mentre ST-258B il cps-2 (*Conte et al., 2016*).

Tn4401 oltre ad essere caratterizzato da un'elevata frequenza di trasposizione che spiega la rapida diffusione della KPC, è stato recentemente individuato in un plasmide (pCOL-1) di *P. aeruginosa*, suggerendo la possibilità di trasferimento del trasposone tra le specie EPA (*Diane and Rolain, 2014*).

[31] Sequence type-258
[32] Ceppo patogeno extra-intestinale MDR ad estensione globale

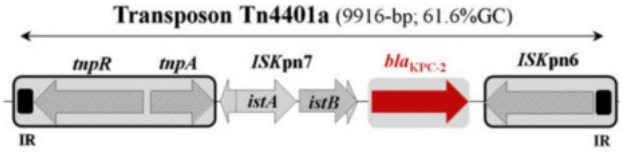


***Figura 7**. Piattaforma genetica del trasposone Tn4401. IR: inverted repeat; tnpR: resolvase; tnpA: transposase; ISKpn7: insertion sequence; istA: transposase A; istB: transposase B; bla_{KPC-2}: carbapenemase-encoding gene; ISKpn6: insertion sequence; IRR, inverted repeat right.*

Dal momento del primo isolamento del gene per la KPC nel North Carolina grazie al progetto ICARE[33] del CDC, si sono susseguiti numerosi casi negli ospedali di New York, con conseguente messa a punto di programmi di sorveglianza. Un esempio è il CRACKLE[34], uno studio multicentrico condotto tra il 2011 e il 2013 negli ospedali di Ohio, Pennsylvania e Michigan che ha evidenziato l'endemicità delle specie CPE[35] produttrici di KPC, con prevalenza di *K. pneumoniae* ST-258. I geni responsabili della resistenza ai carbapenemi, in più del 90% degli isolati analizzati, erano rappresentati da bla_{KPC-2} e bla_{KPC-3} (*Van Duin and Perez, 2014*).

Studi più recenti hanno dimostrato la diffusione di ceppi CPE produttori di KPC in tutti gli Stati Uniti (ad eccezione di Maine e Idaho) e anche in America centro-sud. Interessante è uno studio di due anni (2012-2014) condotto in cinque ospedali della Colombia, da cui è risultato che il 62,2% delle infezioni

[33] Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology
[34] Consortium on resistance against carbapenems in Klebsiella and other Enterobacteriaceae
[35] Enterobatteriaceae produttrici di carbapenemasi

sostenute da questi ceppi presentava un sequence type diverso dal ST-258. Di questi, il 14,2% apparteneva al sequence type ST307 (*Villa et al., 2017*).

I ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC (KPC-Kp) sono definiti endemici, oltre che negli Stati Uniti, anche in Israele, America Latina e Sud Europa.

Per quanto riguarda il nostro continente, l'incidenza delle infezioni sostenute da CPE-KPC è maggiore nelle zone del Mediterraneo: in particolare in Italia e Grecia, dove tra il 2014 ed il 2015 è stata confermata una condizione di endemicità per questi ceppi. È importante tenere conto che prima del 2008 non erano stati registrati casi di ceppi portatori di KPC in Grecia, mentre dal 2014 la maggior parte degli isolati di *K. pneumoniae* è in grado di sintetizzarla (*Van Duin and Doi, 2017*).

1.1.3.3.2. K. pneumoniae-KPC in Italia

Nel 2011 è stato condotto uno studio nazionale trasversale per monitorare la diffusione delle specie CRE, dal quale è risultato che l'87% degli isolati è rappresentato da KPC-Kp appartenente in quantità maggiore al CG258[36] e minore al ST101 (*Conte et al., 2016*). Successivamente, l'AR-ISS[37] ha sottoposto un'ulteriore indagine che ha impegnato 17 laboratori dislocati in tutta Italia nell'analisi di isolati clinici di *K. pneumoniae* in due differenti

[36] Clonal group 258; include ST-258 e varianti come ST-512
[37] Italian Antibiotic-Resistance-Istituto Superiore di Sanità

periodi: da ottobre 2011 a marzo 2012 e tra febbraio e giugno 2013 [Figura 8]. Ne è risultato che delle 461 infezioni del flusso sanguigno sostenute da *K. pneumoniae, il* 36,2% era costituito da ceppi resistenti ai carbapenemi, di cui il 98% era in grado di produrre carbapenemasi. In particolare, il 97% sintetizzava KPC. Per quanto riguarda il *sequence type*, il CG258 era il più diffuso (152 ceppi), essendo stato riscontrato in tutti i laboratori interessati.

Nell'ultimo periodo di analisi è stato notato un aumento dell'incidenza di ST512 rispetto a ST258 (dal 28 al 43%).

In accordo con lo studio di sorveglianza del 2011, quindi, la produzione di KPC rappresenta il meccanismo di resistenza ai carbapenemi più diffuso. Ad ogni modo, anche se il CG258 è il più rappresentato, iniziano a comparire nuovi sequence type (ST15, ST101, ST1879) che suggeriscono il viraggio ad una evoluzione policlonale della popolazione di KPC-Kp.

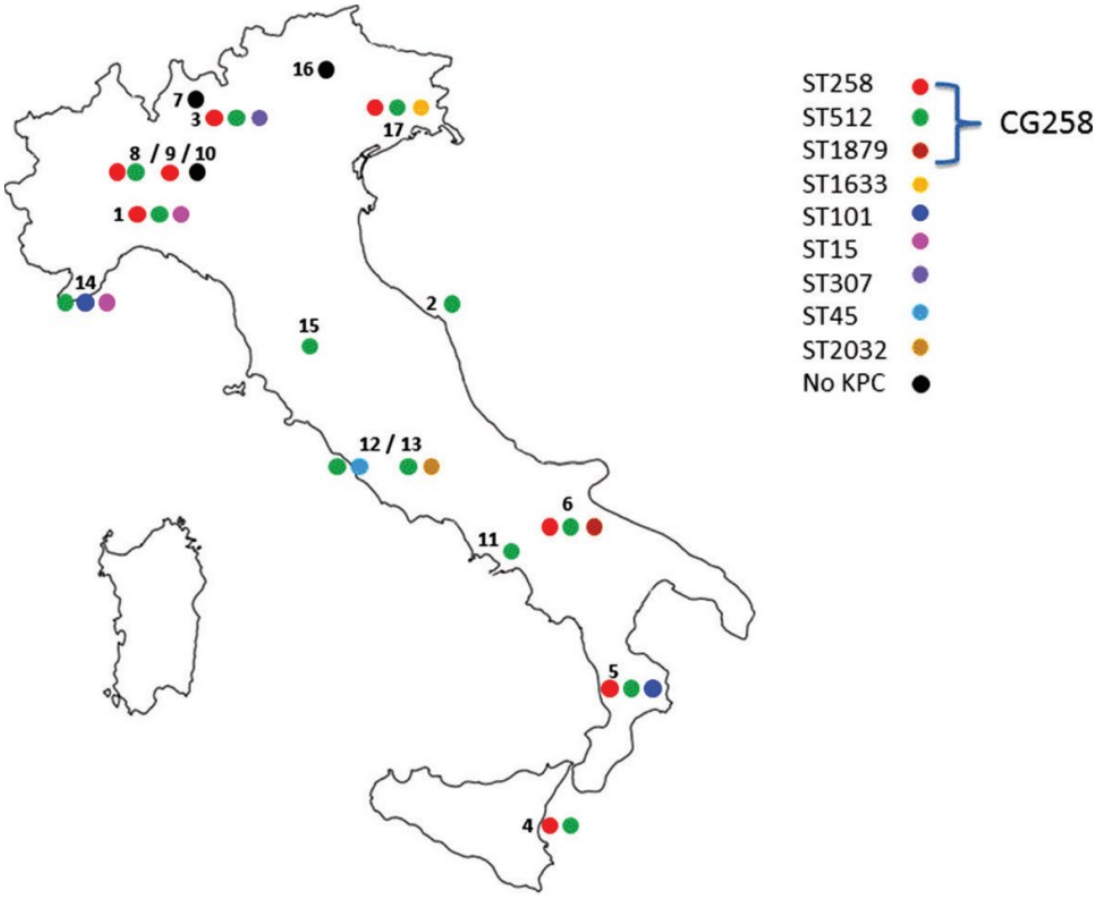


***Figura 8**. Localizzazione geografica dei 17 laboratori impegnati. 1 Alessandria; 2 Ancona; 3 Bergamo; 4 Catania; 5 Cosenza;6 Foggia; 7 Lecco; 8 –10 Milano; 11 Napoli; 12-13 Roma; 14 San Remo; 15 Siena; 16 Trento; 17 Venezia.*

1.1.4. Opzioni terapeutiche

Le infezioni del flusso sanguigno sostenute da KPC-Kp sono associate ad un elevato tasso di mortalità, che oscilla tra il 22 ed il 72% in base alle caratteristiche fisiologiche dei singoli individui (*Brescini et al., 2019*). Il trattamento di queste patologie è reso complesso dal fenotipo MDR dei batteri interessati, che determina l'esito fallimentare delle terapie antibiotiche. L'assenza dello sviluppo di nuovi chemioterapici ha portato alla necessità di riesumare farmaci più datati, come la colistina.

1.1.4.1. Colistina

La colistina, o polimixina E, è stata utilizzata per la prima volta nel 1952 ed è risultata efficace nel trattamento di infezioni sostenute da bacilli Gram negativi fino agli anni ’80, quando è stata scoperta la sua azione nefrotossica (*Biswas and Brunel, 2012*). È una molecola ciclica, caratterizzata da un anello peptidico e da una coda lipofila [Figura 9].

Essendo un antibiotico polipeptidico, il suo bersaglio è la parete cellulare batterica, in particolare il lipopolisaccaride (LPS) dei Gram negativi. La colistina, infatti, è un composto cationico[38] che legandosi al LPS anionico[39] va ad alterare la permeabilità della membrana esterna. Di conseguenza, favorisce la fuoriuscita di metaboliti cellulari con successiva morte del batterio. Per questo è definito come antibiotico battericida.

[38] Dotato di carica positiva
[39] Dotato di carica negativa

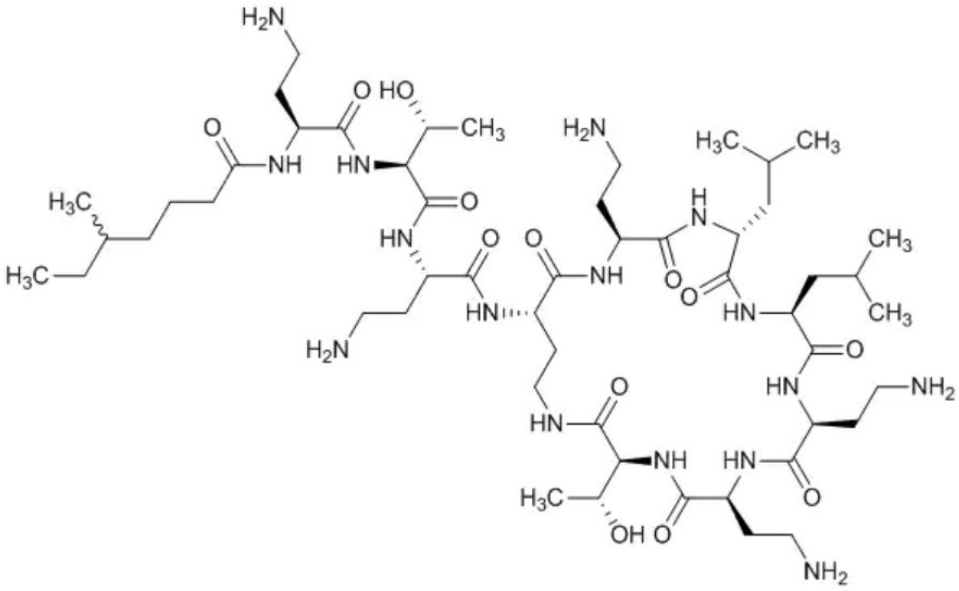


***Figura 9**. Struttura chimica della colistina o polimixina E.*

Prima del 2015, l'individuazione di batteri con resistenza alla colistina avveniva solo di rado ed era considerata una rara mutazione cromosomica, dovuta all'aumento dell'utilizzo del farmaco. Successivamente *Liu et al*. isolarono da maiali cinesi un ceppo di *E. coli* contenente un plasmide, Incl2, caratterizzato dalla presenza del gene *mcr-1*(mobile colistin resistant). Questo gene è responsabile della produzione di una fosfatidiletanolamintrasferasi che induce resistenza alla colistina. Questa scoperta diede il via a numerosi altri studi, come quello condotto da *Newton-Foot at al.* in Sud Africa che confermò la presenza del determinante di resistenza *mcr-1* in isolati clinici di *E. coli* e *K. pneumoniae*. Grazie ad ulteriori analisi, sono stati individuati altri geni *mcr* con distribuzione geografica differente: ad esempio *mcr-4* da *Enterobacteriaceae* in Belgio, Italia e Spagna (*Havenga et al., 2019*).

La resistenza alla colistina, però, non è solamente legata alla produzione di *mcr-1*. L'uso di questo farmaco per il trattamento delle infezioni complicate è aumentato, complice anche l'elevato tasso di resistenza agli altri antibiotici. Questo ha inevitabilmente condotto ad un aumento dei tassi di resistenza a questo antibiotico principalmente a causa di mutazioni genetiche a livello dei geni per la produzione di LPS.

Uno studio condotto tra il 2011 ed il 2015 presso l'Ospedale Universitario Regionale di Ancona, si è proposto di analizzare i campioni clinici di pazienti con infezioni del flusso sanguigno sostenute da KPC-Kp. Ne è risultato che il 59% di tutti gli isolati presenta resistenza alla colistina. In particolare, durante il primo periodo di analisi (2011-2012) il 100% degli isolati era colistino-resistente, mentre negli anni successivi questa percentuale è diminuita fino al 50% (*Brescini et al., 2019*).

Ad ogni modo, la continua comparsa di resistenze alla colistina ha portato alla necessità di sviluppare nuove e alternative strategie antimicrobiche.

1.1.4.2. Ceftazidima-avibactam

L'Avibactam è un nuovo inibitore non β-lattamico delle β-lattamasi che, di recente, ha ricevuto l'approvazione per la commercializzazione in combinazione con la ceftazidima (*Bush, 2018*).

È definito “non β-lattamico” perché non presenta il tipico anello a 4 termini dei β-lattamici ma un diaza-biciclo ottano (*EJ Zasowski, 2015*) [Figura 10].

Il 01-07-2016 Pfizer ha annunciato che la Commissione europea (CE) aveva firmato l’immissione in commercio di questo farmaco, costituito da una quantità fissa di avibactam e dalla già nota cefalosporina di terza generazione ceftazidima.

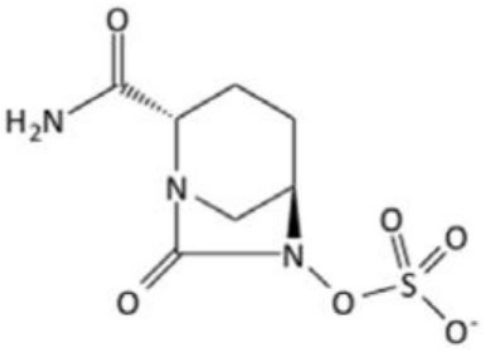


***Figura 10**. Struttra chimica dell'avibatam.*

Come le altre molecole appartenenti a questa classe di inibitori (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam) è in grado di inattivare le β-lattamasi con un meccanismo detto suicida: lega covalentemente l’enzima formando un complesso inattivo [Figura 11]. In questo modo l’azione della ceftazidima nei confronti dei batteri Gram negativi produttori di β-lattamasi, ESBLs incluse, risulta essere estremamente amplificata (*Sharma et al., 2016*).

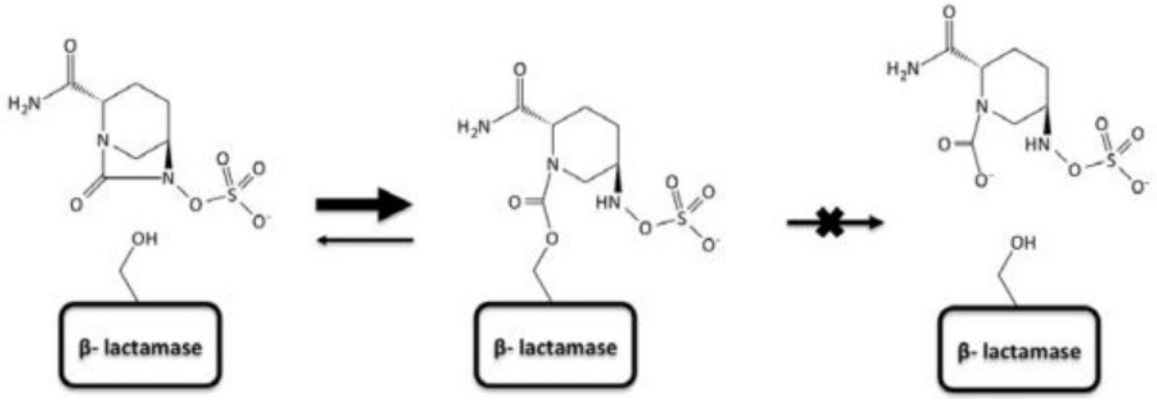


***Figura 11**. Acetilazione delle β-lattamasi ad opera dell'avibactam.*

Nell'Unione Europea la somministrazione endovenosa di ceftazidima-avibactam (in commercio con il nome di Zavicefta®) è approvata per il trattamento di infezioni urinarie ed intra-addominali gravi nell'adulto, di polmoniti nosocomiali e di altre batteriemie difficili da trattare sostenute da Gram negativi aerobi (*Shirley, 2018*).

Ceftazidima-avibactam ha dimostrato di essere efficiente nel trattamento di infezioni sostenute da microrganismi produttori di serino-carbapenemasi, come KPC-Kp, ma non verso le metallo-carbapenemasi. Per il trattamento di queste ultime, si trova in fase 3 di sperimentazione la combinazione dell'avibactam con il monobattame aztreonam (*Bush, 2018*).

I trials clinici condotti su Zaficefta hanno confermato una sua eccellente sicurezza e tollerabilità ma, come per ogni altro farmaco, è bene farne uso solo

nei casi in cui opzioni terapeutiche alternative non sono accessibili, per evitare la comparsa di resistenze.

In realtà, i primi casi di *K. pneumoniae* resistenti al ceftazidime-avibactam sono già stati registrati e riportati in uno studio condotto a Pittsburgh (*Shields et al., 2016*), ma i numeri sono ancora poco significativi.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Ceppi batterici

Sono stati analizzati 89 ceppi di KPC-Kp provenienti da emocolture di pazienti ospedalizzati. 58 degli 89 ceppi sono stati isolati dal Laboratorio di Microbiologia Clinica degli Ospedali Riuniti di Ancona tra il 2016 ed il 2019, 25 provengono dall'ospedale "Santa Croce" di Fano e sono relativi al periodo 2014-2019 mentre, i restanti 6, isolati nello stesso intervallo di tempo, provengono dall'azienda Ospedali Riuniti Marche Nord di Pesaro.

2.2. Antibiotici

Per il test di sensibilità sono stati utilizzati colistina e ceftazidima-avibactam (CZA) acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Co, Milano) sotto forma di polvere. Successivamente sono stati risospesi in un adeguato volume di solvente (acqua) per ottenerli ad una concentrazione finale di 2000 mg/L e 10000 mg/L rispettivamente e conservati a -20 °C.

2.3. Test di sensibilità

Le MICs[40] ai più comuni antibiotici sono state determinate tramite Vitek II system (Biomerieux) o mediante Sensititre Antimicrobial Susceptibility Testing System (ThermoFisher). I valori di inibizione di colistina e CZA sono

[40] Minima Concentrazione Inibente

stati determinati mediante il test di microdiluizione in brodo. Il terreno adoperato è il *Muller Hinton II*[41] (MH II) e l'assorbanza è stata misurata a 625 nm.

Come controlli sono stati utilizzati *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 per il primo antibiotico mentre, per il secondo, anche *K. pneumoniae* ATCC 700603. I valori di MIC ottenuti sono stati interpretati secondo i breakpoint stabiliti dall'EUCAST[42] (EUCAST 2020) e riportati in tabella 3.

***Tabella 3**. Breakpoint dei due antibiotici utilizzati per la determinazione della MIC dei ceppi oggetto di studio*

Antibiotico	Breakpoint Enterobacterales (mg/L)	
	Sensibile	Resistente
Colistina	≤ 2	>2
CZA*	≤8	>8

** Per la determinazione della MIC, la concentrazione di avibactam è fissata a 4 mg/L*

2.4. Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale è stata eseguita mediante il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich).

I ceppi batterici, lasciati crescere overnight su piastra a 37 °C, sono stati risospesi in 5 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere una brodocoltura

[41] A differenza del MH presenta anche cationi calcio e magnesio
[42] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

torbida. Dopo aver prelevato 1 ml e centrifugato per 3 minuti a 12.000 g, il sovranatante è stato eliminato mentre il pellet è stato risospeso in 180 µl di *Lysis solution T*. Per eliminare le molecole di RNA presenti, sono stati aggiunti 20 µl di *RNasi A solution* e, dopo aver aspettato 2 minuti a temperatura ambiente, 20 µl di *proteinasi K* (20 mg/ml) sono stati aggiunti alla soluzione per permettere la rottura della membrana cellulare. Dopo un'incubazione a 55 °C per 30 minuti, si è proceduto alla lisi cellulare aggiungendo 200 µl di *Lysis solution C,* mescolando bene e riponendo nuovamente a 55 °C per 10 minuti, in modo da ottenere una soluzione omogenea.

Al lisato sono stati successivamente uniti 200 µl di etanolo al 95% e miscelati bene, così da determinare la precipitazione del DNA. A questo punto, il campione è stato trasferito sulla colonnina (dopo averla preparata con 500 µl di *Column preparation Solution* e centrifugato per 1 minuto a 12.000 g) e centrifugato a 6.500 g per 1 minuto. Dopo aver eliminato l'eluato, sono stati eseguiti due lavaggi con 500 µl di *Wash Solution* seguiti rispettivamente da centrifugazione per 1 minuto a 6.500 g e per 3 minuti a 12.000 g.

Trasferita la colonnina in una nuova eppendorf si è passati allo step di eluizione con l'aggiunta di 200 µl di *Elution Solution* seguita da centrifugazione a 6.500 g per 1 minuto. Dopo aver ripetuto questo step una seconda volta, il DNA

appena estratto è stato conservato a 4 °C nel caso venisse utilizzato entro una settimana o a -20 °C per tempi più lunghi.

Dopo l'estrazione, è stata valutata la quantità e la qualità del DNA estratto.

2.4.1. Qubit 4

Il Qubit 4 (Invitrogen) è un fluorometro che permette una rapida e sensibile quantificazione di DNA, RNA e proteine [Figura 12]. Il procedimento è molto semplice e consiste nel creare una miscela del DNA estratto e della *Working Solution.* Questa ultima deve essere conservata in frigo ed è costituita da un buffer e da fluorofori[43].

La miscela viene creata unendo 2 µl di DNA e 198 µl di Working Solution, per un totale di 200 µl.

Dopo aver vortexato la soluzione e aspettato due minuti a temperatura ambiente, il campione è stato inserito nel Qubit. A questo punto è necessario

[43] Molecole in grado di assorbire determinate lunghezze d'onda e di emettere fluorescenza

indicare quanto campione è stato aliquotato. Lo strumento esegue la lettura e fornisce una misura della quantità di DNA presente nel campione in ng/µl.

***Figura 12**. Qubit 4; lo schermo touch conferisce facilità nella procedura d'analisi.*

2.4.2. Elettroforesi

Poiché il DNA estratto deve essere successivamente sottoposto ad un esperimento di WGS[44], è importante che non sia eccessivamente frammentato. Per questo motivo, i campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel d'agarosio all'1% [Figura 13].

[44] Whole-Genome Sequencing

Al termine della corsa, se l'impronta lasciata sul gel è uno *smear*, ovvero è una striscia continua e diffusa, significa che il DNA è estremamente frammentato. Se invece sono presenti delle bande nette, indice di elevato peso molecolare dell'acido nucleico, la qualità del nostro campione è buona.

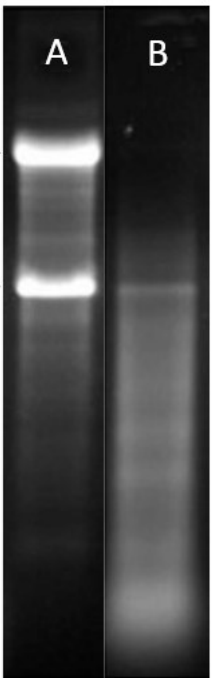


Figura 13. *Bande definite lasciate da DNA ad elevato peso molecolare (A) a confronto con lo smear lasciato da DNA frammentato (B).*

2.5. Saggi di amplificazione

Per verificare la presenza del gene codificante per la KPC, i ceppi sono stati sottoposti a saggi di PCR[45]. Per ottenere gli amplificati sono stati utilizzati la *DreamTaq polymerase* (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) ed i primer riportati in tabella 4.

[45] Polymerase chain reaction

La fase di denaturazione è stata condotta a 94 °C, quella di annealing a 57 °C (in base alle T_m[46] dei primer) e l'allungamento a 72 °C per un minuto. Infatti, la Taq polimerasi processa circa 1000 basi in 30 secondi e, il nostro amplificato, ha una lunghezza di ~900 bp.

I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel d'agarosio all'1% contenente 1X di Green Gel (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia) mediante camera elettroforetica con TAE[47] Buffer e applicando una corrente di 90 Volt. Come peso molecolare standard è stato utilizzato GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

***Tabella 4**. Primer utilizzati in questo studio.*

Gene	Designazione	Sequenza (5'-3')	TM	Lunghezza	Referenza	Dimensione amplicone
bla_{KPC}	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	57 °C	20 basi	Galani	893 bp
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	57 °C	20 basi	et al., 2018	

2.6. Tipizzazione

La tipizzazione molecolare dei ceppi è stata condotta tramite *Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Multi Locus Sequence Typing (MLST).*

[46] Temperatura di melting: temperatura alla quale il 50% dei primer è legata al templato e il 50% non lo è
[47] Tris Acetato EDTA

2.6.1. PFGE

I ceppi, dopo incubazione overnight a 37° su piastre di McConkey, sono stati stemperati in 2 ml di *Suspension Buffer*[48] (SB) e diluiti fino ad ottenere una densità ottica di 0,8 a 610 nm. A questo punto, 350 µl dei campioni sono stati aliquotati in eppendorf con successiva aggiunta di ulteriori 350 µl di Agarosio Low Melt al 1,6%[49], precedentemente sciolto al microonde. Per la creazione delle plugs sono stati utilizzati appositi stampi (*plug-mold*) nei quali è stato versato l'agarosio contente i ceppi batterici e successivamente lasciati asciugare prima a temperatura ambiente e poi in frigo a 4 °C. Avvenuta la solidificazione, le plugs sono state incubate in 2 ml di *Lysis buffer* e proteinasi K a 55 °C per 24 ore.

Sono stati effettuati 5 lavaggi delle plugs per rimuovere completamente le tracce di proteinasi K residue che avrebbero potuto interferire con i successivi step: tre con 5 ml di acqua e due con 5 ml di *TE Buffer*[50]. Metà plug è stata poi incubata overnight con 30 U di XBaI per consentire la digestione del DNA. Per bloccare l'attività enzimatica sono stati aggiunti 500 µl di EDTA 0,5 M e, successivamente, ciascuna plug è stata posta su un pettine ed inclusa all'interno di un gel di Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) all'1%. Le corse

[48] TRIS-HCl 0,1 M + EDTA 0,1 M
[49] 1,6% di Agar e 1% di SDS (sodio dodecilsolfato)
[50] TRIS-HCl 10mM + EDTA 1mM

elettroforetiche, in TBE[51], sono state effettuate tramite l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Biorad) con le seguenti condizioni:

- Tempo: 20 ore
- Campo: 6 V/cm
- Angolo: 120°
- Switch iniziale: 2,2 secondi
- Switch finale: 54,2 secondi
- Ramping factor: lineare

Al termine della corsa, il gel è stato colorato mediante bromuro d'etidio (0,5 µg/ml) e visualizzato al transilluminatore.

I profili di PFGE sono stati poi confrontati tra loro e classificati secondo i criteri di Tenover (Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. (nih.gov)). Profili di restrizione che differiscono per un numero di bande minore o uguale ad uno corrispondono a ceppi strettamente correlati. Se si distinguono da due a tre bande diverse, i pulsotipi sono correlati mentre, con più di tre bande di differenza, i ceppi sono probabilmente non correlati.

[51] Tris Borato EDTA

2.6.2. MLST

La tecnica permette di assegnare un *sequence type* (ST) ai vari isolati batterici sulla base della sequenza allelica di 7 geni *housekeeping*.

Gli ST sono stati ricavati dai dati di WGS (Whole Genome Sequencing) tramite il sito https://www.genomicepidemiology.org/.

2.7. Sequenziamento ed analisi di sequenza

Il sequenziamento dell'intro genoma di un ceppo per ogni pulsotipo individuato al termine della PFGE è stato eseguito tramite NGS usando lo strumento *Oxford Nanopore MinION Mk1B*.

Questo metodo non necessita di una precedente amplificazione del campione, ma solo di estrazione del DNA e preparazione della libreria. Inoltre, è in grado di generare reads anche molto lunghe (oltre le 4 Mb) e la strumentazione è poco ingombrante (105 mm x 33 mm x 23 mm) [Figura 14].

Il MinION è controllato dal software MinKNOW™ e grazie alla porta USB 3.0 lo strumento può essere facilmente collegato al computer.

Il sequenziamento si basa sulla presenza di una membrana, contenuta in una flow cell, a cui è applicato un voltaggio, e attraverso la quale passa la soluzione contenente la/le molecola/e di DNA/RNA da sequenziare. Ogni volta che un

nucleotide attraversa la membrana, viene registrata una specifica variazione nell'intensità di corrente elettrica.

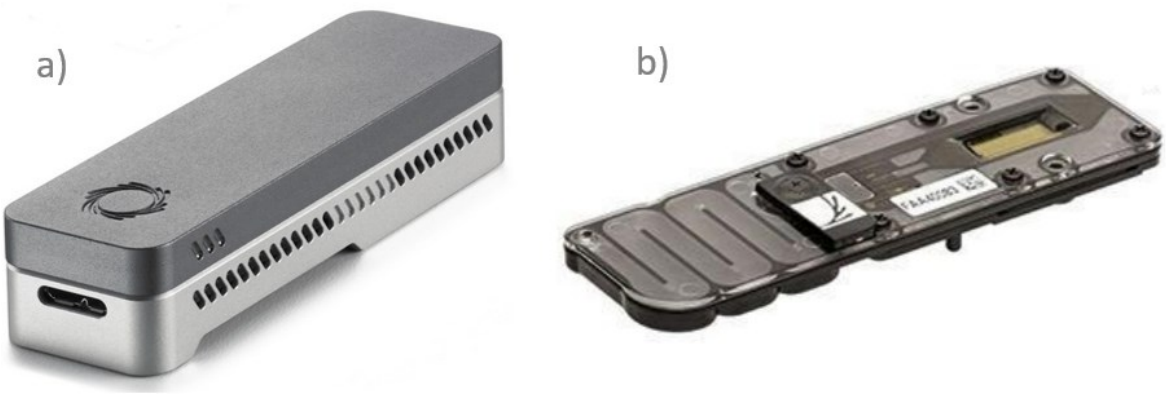


Figura 14. *MinION (a) e flow cell (b)*

Al termine del sequenziamento viene effettuato il *basecalling*, ovvero ciascun segnale elettrico viene convertito nella corrispondente base. Le reads così ottenute sono disponibili in formato fast5 e FASTQ. Inoltre, è possibile valutare l'accuratezza del basecalling grazie all'assegnazione di un punteggio indicato come *QualityScore*.

L'assemblaggio delle reads è stato eseguito mediante il software *Canu* (https://github.com/marbl/canu) ed i risultati sono stati analizzati tramite i software *BLAST* e *ResFinder* (https://www.genomicepidemiology.org/).

2.7.1. Flow cell

Le flow cell utilizzate hanno una dimensione standard di 92.4 mm x 28.0 mm x 5.8 mm e, per questo, si adattano perfettamente sia ai dispositivi MinION che

ai GridION[52]. Sono costituite da una serie di elementi distinti: la priming port, la SpotON port, il sensore ad array, un canale (capacità massima pari a 2 ml) e due porte per l'allontanamento dei rifiuti. Inoltre, sono presenti due valvole incaricate di regolare il flusso dei liquidi attraverso la flow cell [Figura 15].

I campioni (massimo 100 µl) vengono inoculati direttamente nell'array tramite la SpotON port.

Le flow cell vengono consegnate con lo storage buffer all'interno dei canali. Questo è un liquido di conservazione che permette di mantenere l'equilibrio osmotico all'interno della cella ed è costituito da sali e da una coppia redox che consente alla corrente elettrica di fluire attraverso il nanopore. Prima di iniziare l'esperimento, il buffer viene rimosso tramite aspirazione con pipetta dalla priming port e sostituito con il *Flash Buffer* (FB).

Le flow cell contengono 512 pori e presentano 2048 elettrodi disposti in maniera esagonale sulla superficie dell'array. Sono in grado di sequenziare contemporaneamente fino a 12 campioni, riconoscibili grazie ad un precedente processo di *barcoding*. Questo consiste nel legare a ciascuna sequenza di DNA una specifica "etichetta" che ne permette l'identificazione durante e al termine del sequenziamento.

[52] Strumento in grado di leggere contemporaneamente fino a 5 flow cell

Una flow cell integra può essere conservata in frigorifero, ad una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 gradi, per un massimo di 3 mesi mentre, a temperatura ambiente, solo per 30 giorni.

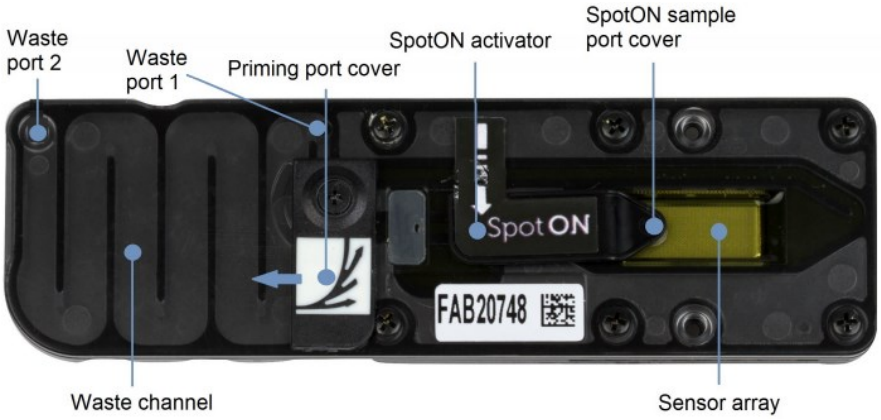


Figura 15. *Struttura di una flow cell*

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

2.7.2. Rapid Sequencing kit

Un kit utilizzato per il sequenziamento è il *Rapid Sequencing kit* (SQK-RAD004), che permette di effettuare un esperimento di sequenziamento in poco tempo dopo aver verificato la qualità e la quantità del DNA estratto.

Questo kit contiene:

- FRA: *Fragmentation mix* (con trasposasi e adattatori delle trasposasi)
- RAP: *Rapid adapter* (adattatori legati a proteine motrici)

- LB: *Loading beads*
- SQB: *Sequencing buffer*

Inoltre, è necessario utilizzare il *Flow Cell Priming Kit* (EXP-FLP002) per avere a disposizione il *Flush Buffer* (FB) ed il *Flush Tether* (FLT).

La preparazione della libreria di DNA richiede 10 minuti di tempo. Per prima cosa si procede allo scongelamento di FRA, RAP, SQB, LB, FB, FLT che devono essere conservati in ghiaccio durante le procedure di preparazione della libreria. Successivamente viene preparata una provettina da PCR con 7,5 µl di DNA (precedentemente diluito in modo da avere almeno 400 ng di DNA) e 2,5 µl di FRA (spinnarlo prima dell'utilizzo). La provetta contenente la soluzione ben miscelata viene inserita nel termociclatore per la fase di frammentazione (1 minuto a 30 °C e un altro a 80 °C). La provetta viene poi riposta in ghiaccio per abbassare la temperatura.

Lo step successivo consiste nel legame degli adattatori di sequenziamento aggiungendo 1 µl di RAP ai 10 µl di DNA tagmentato. Dopo aver mescolato adeguatamente e incubato 5 minuti a temperatura ambiente, la libreria di DNA è stata riposta in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo.

Una volta preparata la libreria si procede con il Priming della cella di sequenziamento. Vengono rimossi 20-30 µl di *Storage Buffer* presenti nella

flow cell con una p1000 tramite la priming port, facendo attenzione a non introdurre bolle d'aria nella camera.

La preparazione del *Priming mix* richiede di aggiungere 30 µl di FLT direttamente nel tubo di FB. Dopo aver mescolato la soluzione, si prelevano 800 µl e si inseriscono nella priming port.

A questo punto è necessario preparare la libreria al caricamento sul dispositivo.

In una nuova eppendorf vengono mescolati:

- 34 µl di SQB
- 11 µl di libreria DNA
- 4,5 µl di nuclease-free water
- 25,5 µl di LB (vortexare appena prima dell'uso per evitare il deposito delle biglie)

Dopo l'apertura della SpotON port, vengono aggiunti altri 200 µl di *Priming Mix* alla priming port. Come ultimo step, si inoculano goccia a goccia i 75 µl di libreria nella SpotON port.

Chiudere entrambe le porte, il MinION e aprire il programma MinKNOW per iniziare il sequenziamento.

2.7.3. Rapid Barcoding Sequencing

Il *Rapid Barcoding kit* (SQK-RBK004) permette di sequenziare contemporaneamente fino a 12 campioni di DNA. A differenza del kit precedente, al posto di FRA sono presenti 12 diversi *Fragmentation Mix* indicati come RB0-12.

La preparazione della libreria segue gli step indicati per il rapid sequencing kit (paragrafo 2.7.2) ma, il kit permette di preparare dodici librerie differenti, ciascuna costituita da 7,5 µl del DNA di un campione e 2,5 µl del RB specifico che possono essere unite e sequenziate nella stessa corsa. Al termine del passaggio al termociclatore, il materiale presente nelle 12 provette viene prelevato ed unito in un'unica provetta da 1,5 ml, alla quale viene aggiunto un ugual volume di AMPure XP beads[53] appena mescolate per purificare ulteriormente il pool di librerie creato. Le biglie, cariche positivamente, legano il DNA e permettono la purificazione dalle altre sostanze indesiderate.

La eppendorf contenente le biglie legate al DNA viene posizionata su un magnete e, una volta depositate le biglie, si procede all'eliminazione del sovranatante [Figura 16]. Il pellet viene lavato aggiungendo e rimuovendo

[53] Sospensione di biglie magnetiche

200 µl di etanolo al 70% senza risospendere il pellet. Questo passaggio è ripetuto due volte e viene seguito da una fase di asciugatura del precipitato con provetta aperta.

Una volta che il pellet si è asciugato, si rimuove la eppendorf dal magnete e si lascia due minuti a temperatura ambiente dopo aver risospeso il precipitato in 12 µl di una soluzione TrisHCl-NaCl[54].

A questo punto, si riposiziona la eppendorf sul magnete e, poiché il DNA purificato si trova nel sovranatante, si prelevano i 12 µl di soluzione di eluizione, di cui 10 serviranno per la creazione della libreria (a cui sarà aggiunto 1 µl di RAP) e 2 per effettuare una ri-quantizzazione al Qubit 4.

Il priming e il caricamento della libreria procedono come già indicato nel paragrafo 2.7.2.

[54] TrisHCl 10 mM a pH 7,5-8,0 + NaCl 50 mM

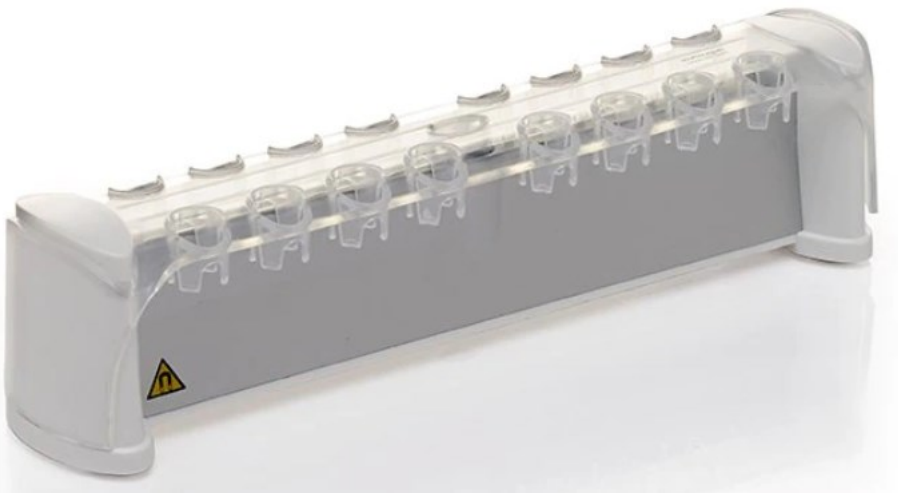


Figura 16. *Magnetic rack; le biglie, legate al DNA, vengono attratte dal magnete, per cui si posizionano sul lato della eppendorf a contatto con esso.*

2.7.4. Analisi di sequenza

Una volta ottenute ed assemblate le reads con *Canu*, si procede all'analisi del genoma tramite il sito *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) sfruttando i software *ResFinder*, *PlasmidFinder*, *MLST* e *VirulenceFinder*.

3. RISULTATI

3.1. Determinazione delle MIC

Le MICs per gentamicina[55], tigeciclina[56], meropenem, imipenem, ertapenem, ceftazidime e ciprofloxacina[57] per i 58 ceppi isolati nel Laboratorio di Microbiologia Clinica degli Ospedali Riuniti di Ancona sono riportate in tabella [Tabella 5].

Quasi la totalità dei ceppi è risultata non suscettibile ai tre carbapenemi, alla ciprofloxacina e al ceftazidime mentre, a livello di gentamicina e tigeciclina la resistenza è del 19,3% e del 5,9% rispettivamente.

***Tabella 5**. Valori di MIC e relativa classificazione agli antibiotici testati su Kp-KPC isolate negli Ospedali Riuniti di Ancona*

KP-KPC isolato	Anno	MIC						
		Gentamicina	Tigeciclina	Meropenem	Imipenem	Ertapenem	Ceftazidime	Ciprofloxacina
278441	2016	2 (S)	0,5 (S)	8 (I)	2 (I)	8 (I)	≥64 (R)	≥4 (R)
279020	2016	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
294032	2016	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	8 (I)	NA	>16 (R)	>2 (R)
300445/4	2016	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
303792	2016	<1 (S)	<0,25 (S)	8 (I)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	>2 (R)
308401	2016	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
308802	2016	>8 (R)	0,5 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
320752	2016	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
331430	2016	2 (S)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
333745	2016	<1 (S)	0,5 (S)	>4 (R)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
336861/3	2016	2 (S)	1 (S)	≥16 (R)	8 (I)	NA	≥64 (R)	≥4 (R)
345073	2017	4 (I)	NA	≥16 (R)	≥16 (R)	NA	≥64 (R)	≥4 (R)
348663	2017	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
348739	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
360902	2017	>8 (R)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)

[55] Antibiotico amminoglicosidico ad ampio spettro
[56] Antibiotico glicilciclinico
[57] Antibiotico fluorochinolonico

367682	2017	<1 (S)	2 (I)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
368669	2017	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
372902	2017	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
373422	2017	>8 (R)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
373449	2017	>8 (R)	4 (R)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
375861	2017	≤0,25 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
376009	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>4 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
378180	2017	>8 (R)	2 (I)	>8 (R)	8 (I)	NA	>16 (R)	>2 (R)
379098	2017	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	NA
380035	2017	<1 (S)	>8 (R)	8 (I)	R>16	>8 (R)	>64 (R)	>4 (R)
380566	2017	2 (S)	2 (I)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
383512	2017	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
396128	2017	<1 (S)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
397255	2017	<1 (S)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
400683	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
402951	2017	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
403032	2017	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
405995	2017	≥16 (R)	1 (S)	>16 (R)	8 (I)	≥8 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)
407607	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
408936	2017	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
414811	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
415373	2017	>8 (R)	0,5 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	≤1 (S)	>2 (R)
415849	2017	<1 (S)	2 (I)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
416185/1	2017	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
420413	2018	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
421644	2018	>8 (R)	0,5 (S)	8 (I)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
421963	2018	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
423068	2018	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
423388	2018	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	≤1 (S)	>2 (R)
424838/3	2018	>8 (R)	1 (S)	>8 (R)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
442113	2018	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
447851	2018	<1 (S)	0,5 (S)	8 (I)	2 (S)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
449883	2018	<1 (S)	1 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
466498	2018	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
480072	2018	<1 (S)	NA	≥16 (R)	NA	≥8 (R)	≥64 (R)	≤0,12 (S)
484459	2018	>8 (R)	1 (S)	>8 (R)	8 (I)	>4 (R)	>16 (R)	NA
484969/3	2018	<1 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
523174	2019	2 (S)	0,5 (S)	>8 (R)	>8 (R)	>4 (R)	>16 (R)	>2 (R)
533863	2019	2 (S)	2 (I)	≥16 (R)	NA	≥8 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)
541994	2019	4 (S)	1 (S)	≥16 (R)	NA	≥8 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)
551707	2019	<1 (S)	NA	≤0,25 (S)	NA	≤0,12 (S)	0,25 (S)	≤0,12 (S)
551892	2019	≥16 (R)	2 (I)	≥16 (R)	NA	≥8 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)

S= sensibile; R= resistente; I= intermedio; NA= not applicable

Per quanto riguarda, invece, la determinazione delle MICs a colistina e ceftazidime-avibactam, è stato utilizzato il metodo della microdiluizione in brodo per tutti gli 89 ceppi in esame, provenienti quindi anche da Pesaro e Fano. Non è stato evidenziato alcun fenotipo di resistenza verso il ceftazidime-avibactam, in quanto tutti i ceppi hanno mostrato valori di MIC minori o uguali a 8 mg/L, in accordo con i breakpoints di EUCAST.

Relativamente alla colistina, invece, 26 ceppi sono risultati resistenti, con un valore di MIC superiore a 2 mg/L [Figura 17].

In totale, quindi, la percentuale di incidenza del fenotipo resistente alla colistina negli isolati clinici da sangue di KPC-Kp ammonta al 29,21%.

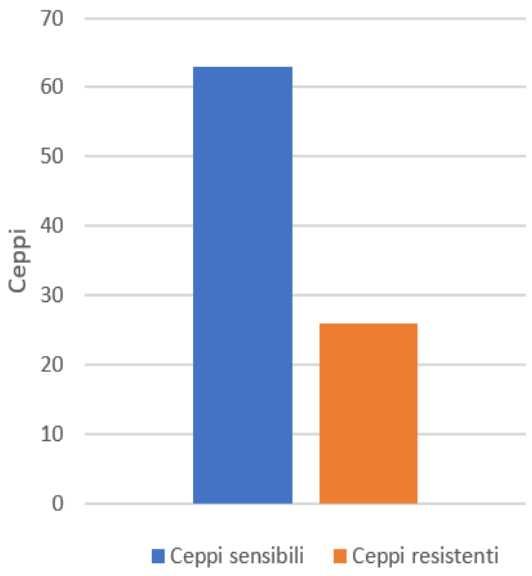


Figura 17. *Rapporto tra ceppi di K. pneumoniae sensibili e resistenti alla colistina*

3.1.1. Resistenza alla colistina per aree geografiche

Andando ad analizzare il fenotipo di resistenza alla colistina in base all'area geografica di isolamento, vediamo che dei 26 ceppi resistenti, 19 provengono da Ancona, 2 da Pesaro ed i restanti 5 da Fano.

La percentuale di resistenza alla colistina ammonta, quindi, al 32,76% per gli isolati del capoluogo di Regione, al 33,33% per i ceppi di Pesaro e al 20% per quelli di Fano, a fronte di una resistenza complessiva del 29,21% [Figura 18].

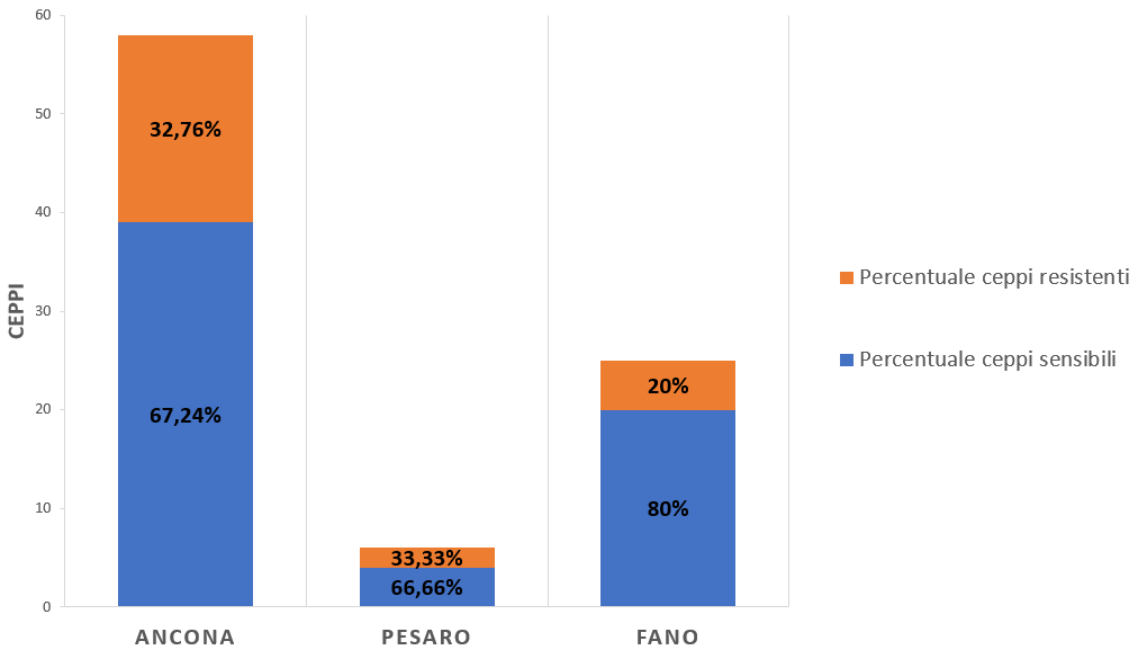


***Figura 18**. Percentuale ceppi resistenti/sensibili divisi per località.*

3.1.2. Resistenza alla colistina tra il 2014 ed il 2019

Considerando l'andamento annuale, vediamo che nel 2014 e nel 2015 la percentuale di resistenza alla colistina era estremamente alta, 100% e 50% rispettivamente, a fronte di un numero di casi non significativo (uno e quattro).

Dal 2016 al 2018 la resistenza alla colistina, ha seguito un trend crescente passando dal 30,77% al 32,26% al 36,36% rispettivamente. Nel 2019, invece, la percentuale è calata all'11,11% [Figura 19].

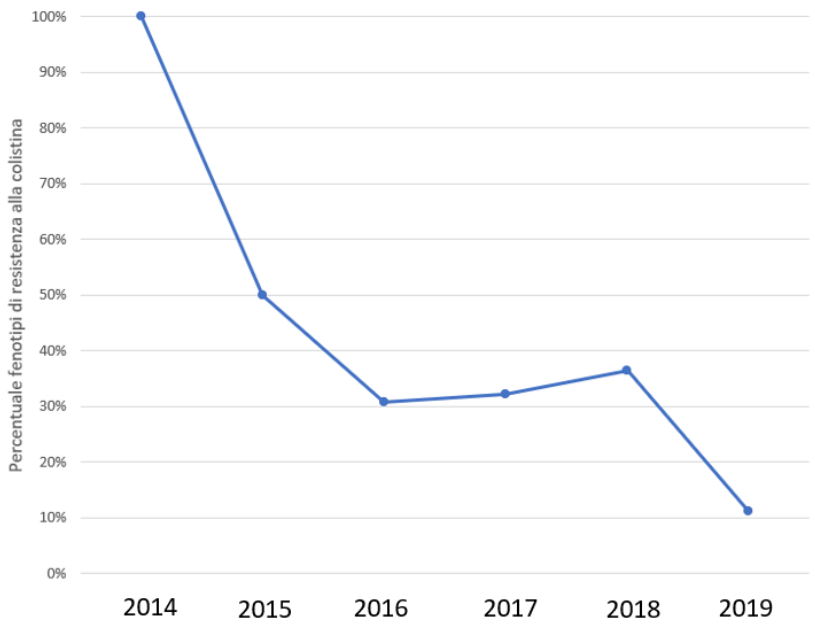


***Figura 19**. Trend della resistenza alla colistina in ceppi Kp-KPC isolati tra il 2014 ed il 2019*

Per quanto riguarda la città di Ancona, la percentuale di fenotipi resistenti nei primi tre anni di studio (2016-2018) segue una curva crescente, ammontando rispettivamente al 27,27%, 32,14% e 46,15%. Nel 2019, invece, oltre ad essere diminuiti i casi di infezioni del flusso sanguigno causate da KPC-Kp (solo sei casi), è anche calata la percentuale di resistenza, fissandosi al 16,67% [Figura 20].

A Pesaro, gli unici due ceppi Kp-KPC resistenti alla colistina sono stati isolati nel 2015, registrando una percentuale del 66,66%. I restanti quattro ceppi

raccolti tra il 2018 ed il 2019 non mostrano questo fenotipo, determinando un calo drastico della percentuale riconducibile allo 0%.

Anche a Fano, a partire dal 2016 è riscontrabile la progressiva diminuzione della resistenza a questo antibiotico a discapito, però, dell'aumento dei casi di infezioni del flusso sanguigno sostenute da Kp-KPC. Infatti, nel 2016 sono stati registrati due casi di cui uno con fenotipo resistente (50%), nel 2017 tre isolati con percentuale di resistenza del 33,33%, nel 2018 otto episodi di cui due resistenti (25%) e nel 2019 un solo ceppo resistente su un totale di dieci (10%) [Figura 21].

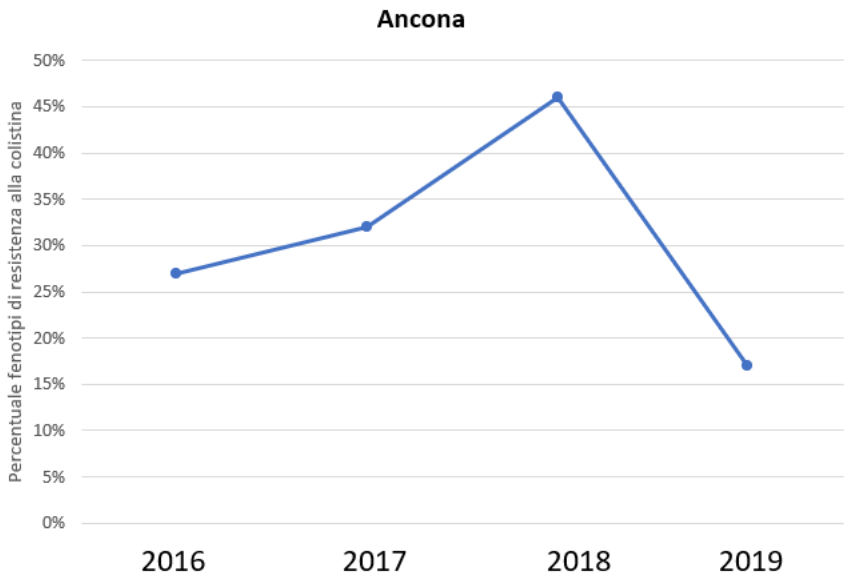


***Figura 20**. Trend dei fenotipi resistenti alla colistina di Kp-KPC isolati tra il 2016 ed il 2019 nel Laboratorio di Microbiologia Clinica degli Ospedali Riuniti di Ancona.*

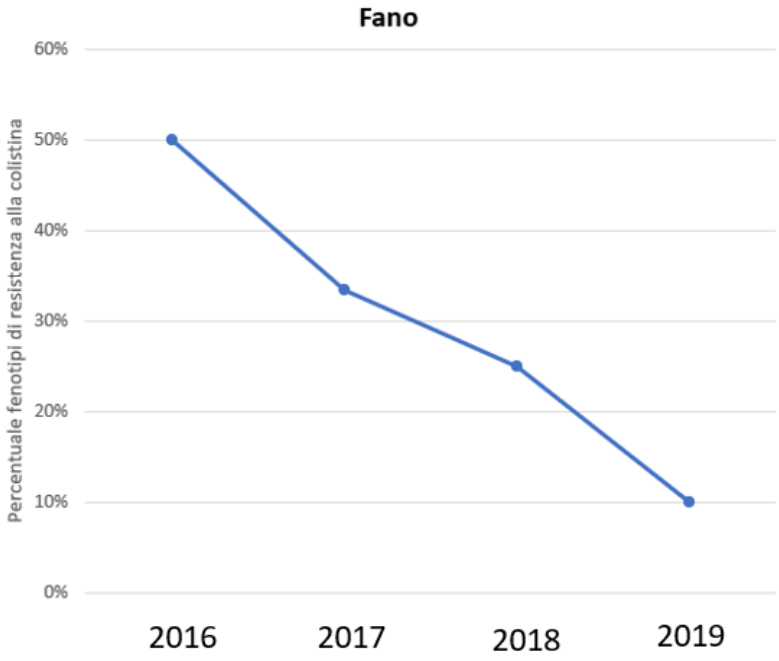


***Figura 211**. Trend dei fenotipi resistenti alla colistina di Kp-KPC isolati tra il 2016 ed il 2019 nell'ospedale Santa Croce di Fano.*

3.2. Saggi di amplificazione

Tutti gli 89 ceppi analizzati sono risultati positivi ai saggi di amplificazione condotti con i primer KPC-F e KPC-R. Questo ha quindi confermato che la totalità degli isolati considerati è caratterizzata dalla presenza del gene bla_{KPC} codificante per la serino-carbapenemasi KPC.

3.3. Tipizzazione

I risultati degli esperimenti di PFGE hanno evidenziato la presenza di 30 diversi pulsotipi, indicati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla T [Figura 22].

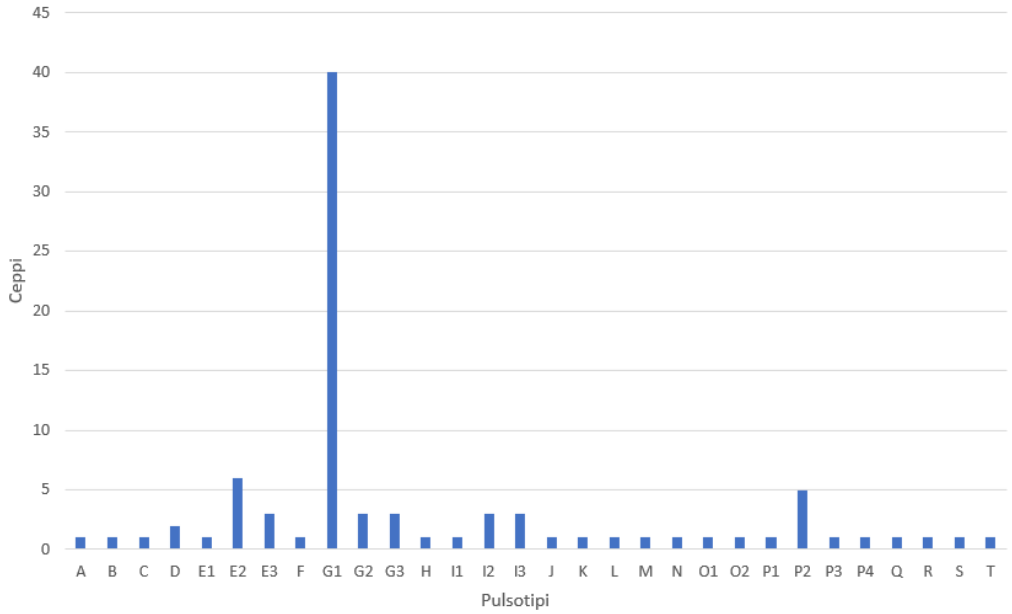
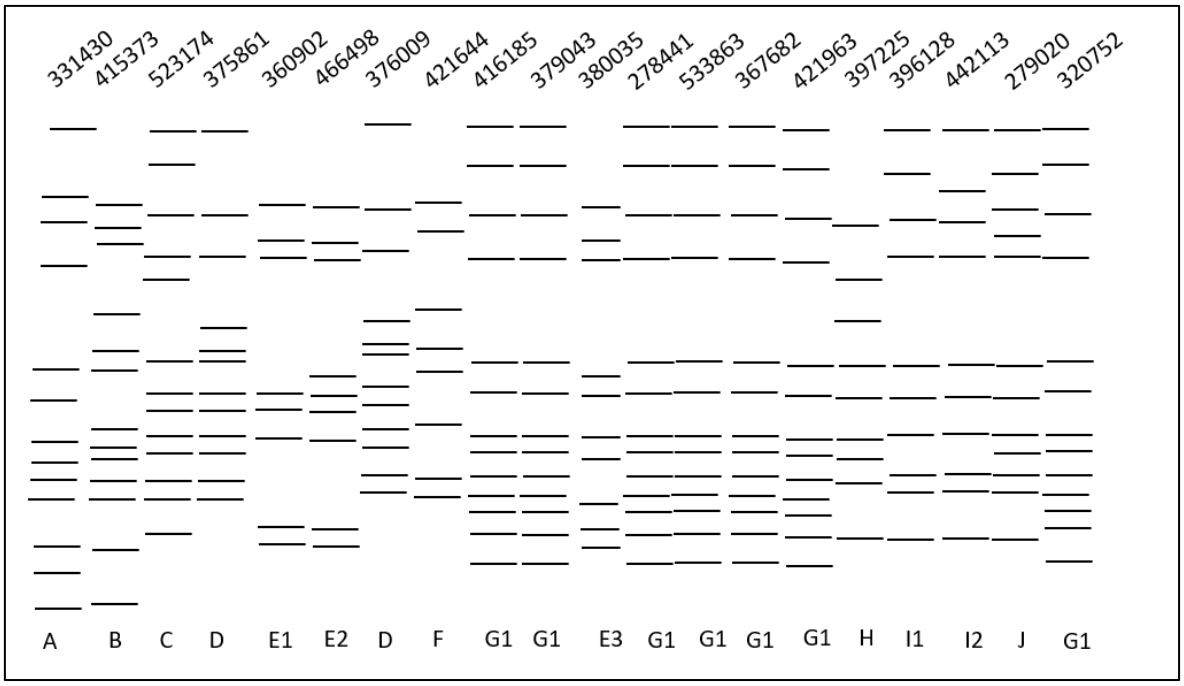


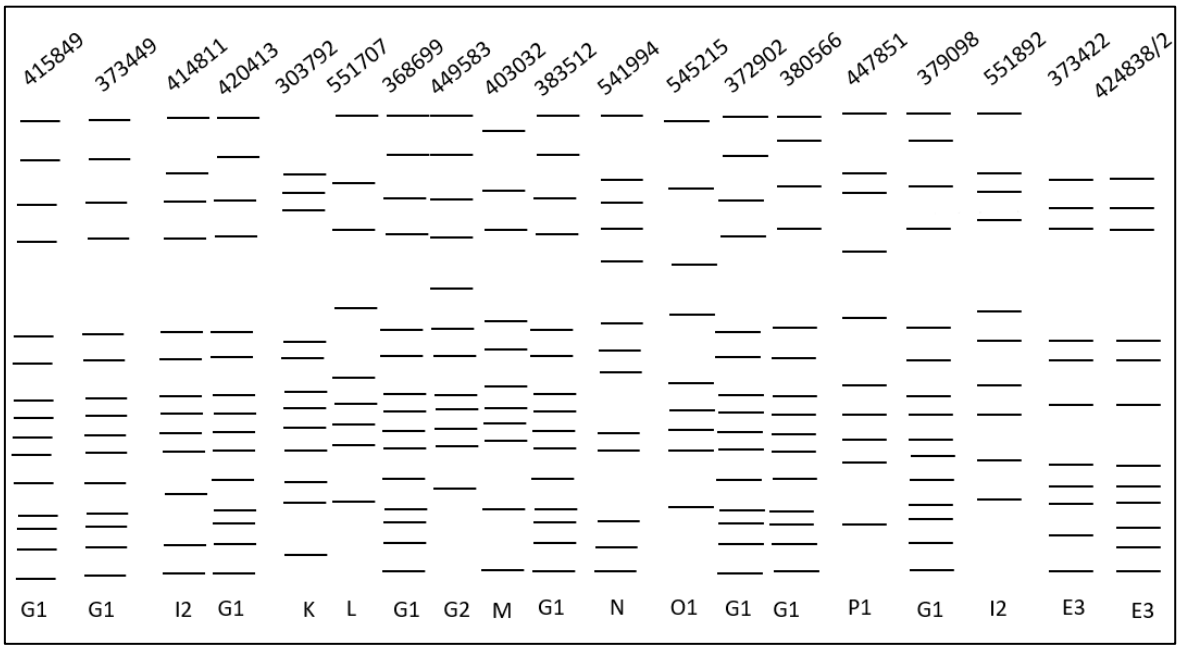
Figura 22. *Frequenza dei 30 diversi pulsotipi identificati in PFGE.*

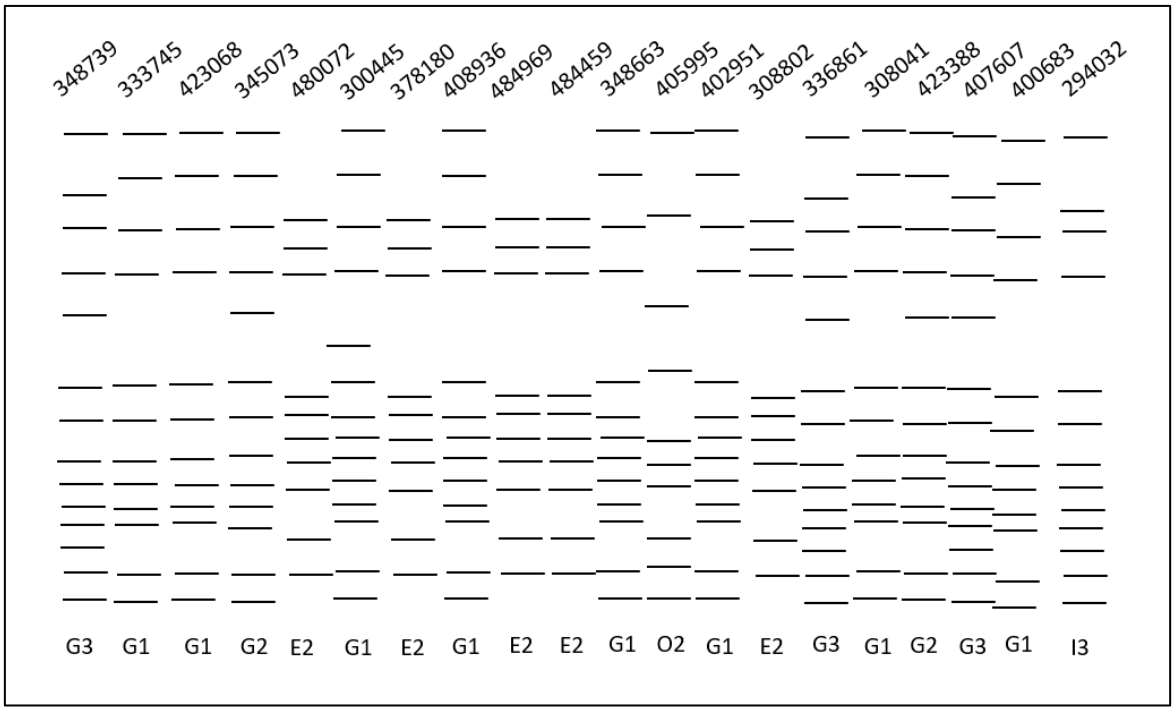
Il pulsotipo più rappresentato è il G1, con 40 ceppi caratterizzati dallo stesso pattern di restrizione e corrispondenti ad un'incidenza del 44,94%. Lo ritroviamo sia negli isolati provenienti da Ancona (37,93%), sia in quelli di Pesaro (50%) che in quelli di Fano (60%). Tramite analisi MLST è stato possibile correlare il pulsotipo G1 al *sequence type* ST512, noto per essere ampiamente diffuso nel nostro Paese.

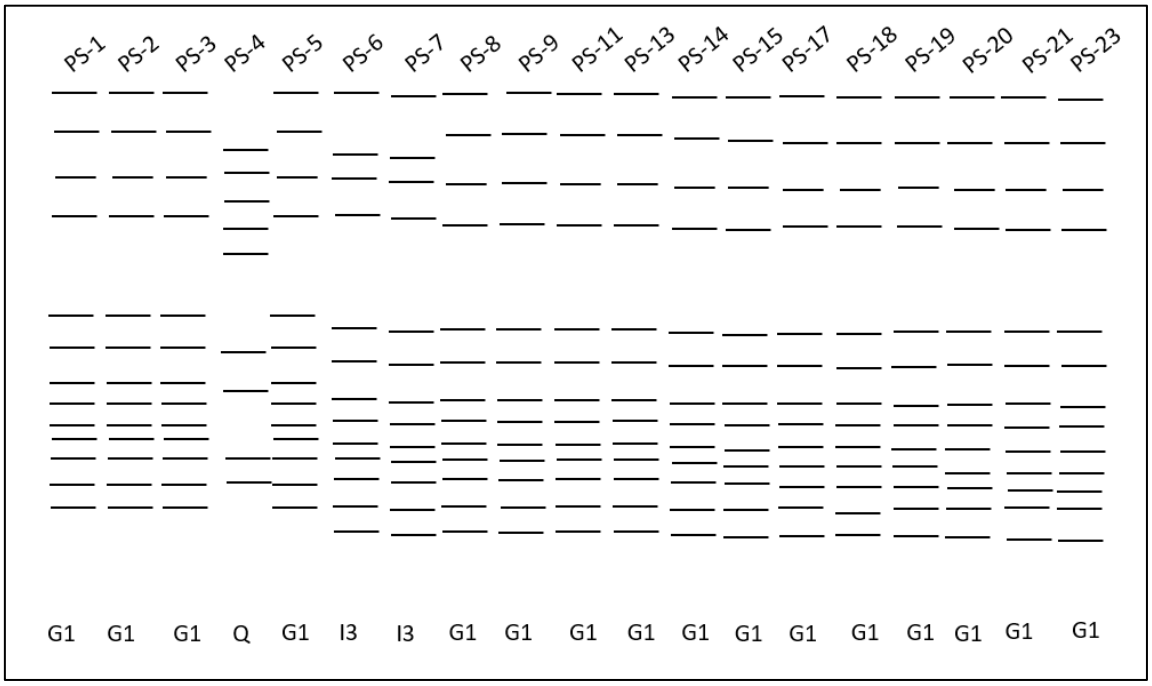
Un cluster ben affermato nella provincia di Pesaro e assente, invece, nel capoluogo di Regione è quello indicato dalla lettera P. Infatti, 7 ceppi su 31 appartengono a questo gruppo. A seguito dell'analisi MLST questo pulsotipo è stato catalogato come *sequence type* ST307.

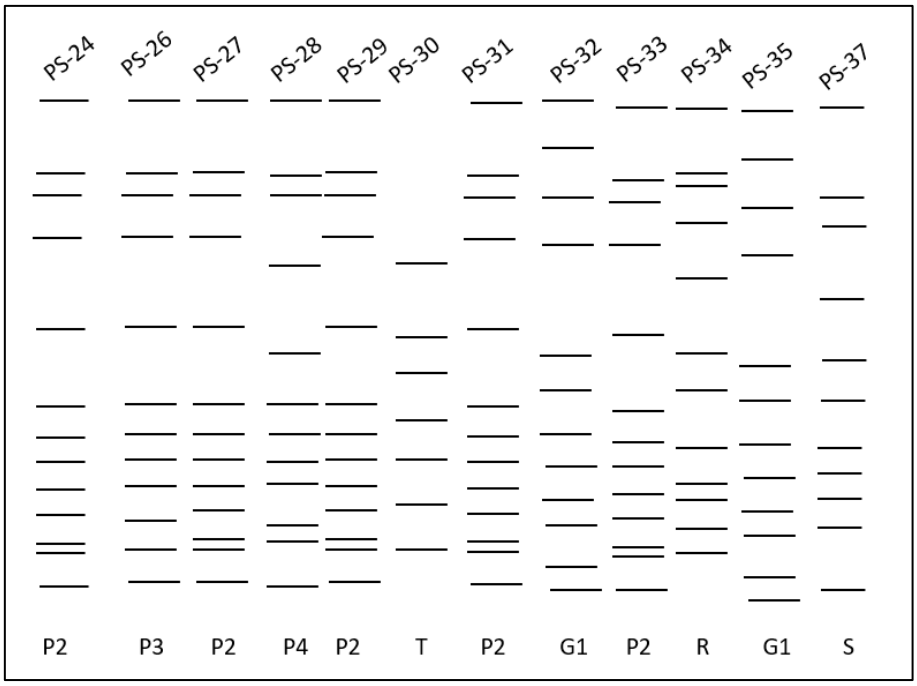
Di seguito riporto i risultati di PFGE visualizzati al transilluminatore.


331430
415373
523174
375861
360902
466498
376009
421644
416185
379043
380035
278441
533863
367682
421963
397225
396128
442113
279020
320752
A
B
C
D
E1
E2
D
F
G1
G1
E3
G1
G1
G1
G1
H
I1
I2
J
G1


415849
373449
414811
420413
303792
551707
368699
449583
403032
383512
541994
545215
372902
380566
447851
379098
551892
373422
424838/2
G1
G1
I2
G1
K
L
G1
G2
M
G1
N
O1
G1
G1
P1
G1
I2
E3
E3


348739
333745
423068
345073
480072
300445
378180
408936
484969
484459
348663
405995
402951
308802
336861
308041
423388
407607
400683
294032
G3 G1 G1 G2 E2 G1 E2 G1 E2 E2 G1 O2 G1 E2 G3 G1 G2 G3 G1 I3


PS-1
PS-2
PS-3
PS-4
PS-5
PS-6
PS-7
PS-8
PS-9
PS-11
PS-13
PS-14
PS-15
PS-17
PS-18
PS-19
PS-20
PS-21
PS-23
G1 G1 G1 Q G1 I3 I3 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1



3.3.1. Distribuzione del pulsotipo G1 negli anni e nelle zone di studio

Il pulsotipo G1 risulta essere quello più frequentemente riscontrato nelle infezioni del flusso sanguigno in ambito ospedaliero. I dati raccolti da Brescini e collaboratori riguardo la situazione ad Ancona nel 2014-2015 indicano un'incidenza di questo pulsotipo pari al 41% e 45% rispettivamente (*Brescini et al., 2019*) [Figura 23]. L'unico ceppo isolato nel 2014 a Fano apparteneva a questo cluster, così come tre dei quattro ceppi relativi al 2015, provenienti da Pesaro e Fano. Nell'anno successivo, invece, a Fano sono stati isolati solo due ceppi, entrambi appartenenti ad un pulsotipo differente dal G1: l'I3. Diversa era la situazione ad Ancona, dove 5 isolati su 11 erano riconducibili al G1.

Nel 2017, più della metà degli isolati apparteneva a questo cluster. In particolare, la totalità dei ceppi provenienti da Fano e il 46% di quelli di Ancona. Anche nel 2018 l'incidenza di questo pulsotipo si è mantenuta elevata nella provincia di Pesaro, caratterizzando tutti e 9 gli isolati. Al contrario, in Ancona la percentuale è calata fino al 23%.

Nell'ultimo anno di studio, su 18 isolati clinici di Kp-KPC solo 3 hanno mostrato un pulsotipo riconducibile al G1. Andando più nel dettaglio, la percentuale di incidenza di questo cluster si afferma al 16,67% sia in Ancona (1 ceppo su 6) che nella provincia di Pesaro (2 ceppi su 12).

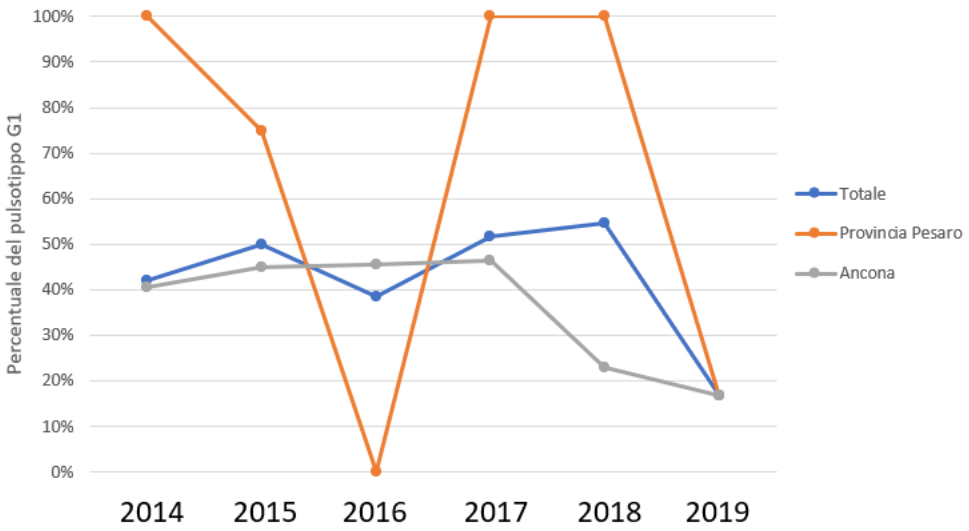


***Figura 22**. Incidenza del pulsoptipo G1 tra il 2014 ed il 2019 sia in totale che diviso per zone di isolamento. I dati di Ancona relativi al periodo 2014-2015 fanno riferimento allo studio di Brescini e collaboratori (Brescini et al., 2019).*

3.4. Sequenziamento ed analisi di sequenza

Il sequenziamento con il Nanopore è stato condotto sul ceppo *533863* appartenente al pulsotipo G1 e sul *PS-24* del cluster P2.

L'analisi è durata 3 ore e 30 minuti ed ha portato rispettivamente alla sintesi di 12650 e 21285 reads utilizzabili per l'assemblaggio. Considerando che il genoma di *K. pneumoniae* è lungo circa 5,5 milioni di basi, la coverage[58] ottenuta in entrambi i casi è del 40X. Inoltre, l'N50[59] ha raggiunto un valore di 17589 per *Kp-533863* e di 11429 per *Kp-PS24*.

3.4.1. K. pneumoniae 533863

Le reads sono state assemblate mediate il software Canu in 4 contig[60], di cui il primo è quello di dimensioni maggiori: 5326288 basi. Gli altri 3 sono caratterizzati, invece, da un minor numero sia di nucleotidi che di reads [Tabella 6].

***Tabella 6**. Codici identificativi dei contig e relative lunghezze e reads.*

Contig	Dimensione	Reads	Circolarizzazione
1	5326288 basi	11537	No
3	191678 basi	535	Si
480	72642 basi	104	No
481	5394 basi	1	No

Tramite il sito *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) è stato possibile condurre un'analisi più approfondita del genoma sequenziato. Sono risultati

[58] Valore che indica la frequenza con cui ciascun nucleotide del genoma sottoposto all'analisi viene letto dal sequenziatore; più questo valore è alto, più il risultato è attendibile.
[59] Valore che indica la media della lunghezza delle reads. Deve essere compreso tra 8000 e 9000.
[60] Serie di frammenti di DNA che, grazie alla presenza di regioni di sovrapposizione, permettono di ricostruire porzioni di cromosomi e/o plasmidi.

utili a questo studio i software *PlasmidFinder, ResFinder, MLST,* e *VirulenceFinder*.

3.4.1.1. PlasmidFinder

Questo software permette di individuare eventuali geni codificanti replication protein di plasmidi presenti nella sequenza genomica in analisi.

Nel nostro caso, vengono evidenziati tre gruppi di incompatibilità[61]: IncFIB(pQil), IncFIB(K) e IncFII(K) [Tabella 7].

IncFIB(pQil) è individuabile a livello del contig 480 ed è un gruppo di incompatibilità identificato sul plasmide pQIL-IT di *K. pneumoniae ST258*.

Anche IncFIB(K) è caratteristico di *K. pneumoniae ST258* ma a livello di un plasmide diverso: pKPN-IT. Ritroviamo questo gruppo di incompatibilità a livello del contig 3 assieme a IncFII(K).

IncFII(K) è, invece, un gruppo di incompatibilità del plasmide pKPN3 di *K. pneumoniae subspecie pneumoniae* MGH 78578.

[61] Impediscono a plasmidi appartenenti allo stesso gruppo di incompatibilità di replicarsi all'interno della stessa cellula

Tabella 76. Gruppi di incompatibilità e loro caratteristiche

Plasmide	Identità	Lunghezza query/ lunghezza gene	Contig	Posizione nel contig	N° identificativo
IncFIB(pQil)	100	740 / 740	tig00000480 len=72642 reads=104 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	23863..24602	JN233705
IncFIB(K)	99.64	560 / 560	tig00000003 len=191678 reads=535 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	74602..75160	JN233704
IncFII(K)	99.32	148 / 148	tig00000003 len=191678 reads=535 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	8394..8540	CP000648

3.4.1.2. BLAST

Andando ad allineare tra loro i contig 480 e 481 abbiamo ottenuto un 99,69% di identità ed una cover del 78%. Analizzando i matches ottenuti è stato possibile constatare che si tratta di un unico plasmide. Infatti, utilizzando come query la sequenza FASTA del contig 480 e come subject quella del 481 è stata trovata corrispondenza tra le regioni da 1 base a 2,3 kb, da 10 kb a 10,7 kb, da 13 kb a 14 kb e da 19 kb a 72 kb [Figura 24].

Da questo momento in poi, questo unico contig verrà indicato con il codice identificativo 480.

Per quanto riguarda il contig 3, invece, viene suggerita la sua circolarizzazione grazie alla presenza di una stessa sequenza ad entrambe le estremità. Dopo aver individuato questa zona di sovrapposizione, pari a ~20 kb, è stata eliminata per poter ricostruire il plasmide.

Possiamo dire, quindi, che il genoma di *Kp-533863* sia costituito da un cromosoma di circa 5326 kb (contig 1) e da due plasmidi di circa 170 kb (contig 3) e 72 kb (contig 480) rispettivamente. Il plasmide di dimensioni maggiori, relativo al gene *bla*, mostra il 93% di coverage ed il 99,63% di identità con il plasmide *pBK32179* dell'omonimo ceppo di *K. pneumoniae* (JX430448.1).

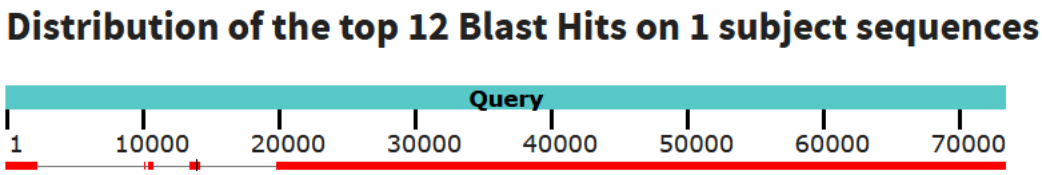


Figura 23. *Risultato grafico dell'allineamento tra i contig 480 (query) e 481 (subject).*

3.4.1.3. ResFinder

Per quanto riguarda i β-lattamici, il determinante genetico acquisito da *Kp-KPC 533863* è in primo luogo il gene bla_{KPC-3}, responsabile della sintesi dell'omonima carbapenemasi [Tabella 8]. Questo è situato sul contig 3 ed è, quindi, a localizzazione plasmidica. Le analisi eseguite mediante BLAST

hanno indicato che questo determinante di resistenza è localizzato a livello del trasposone Tn4401.

Oltre al gene bla_{KPC-3} è presente anche il gene $bla_{SHV-182}$, codificante per una β-lattamasi a spettro esteso. Questo determinante di resistenza è a localizzazione cromosomica, in quanto è situato nel contig 1.

Tabella 8. *Determinanti di resistenza di Kp-KPC 533863 e relative caratteristiche*

Gene di resistenza	Identità	Lunghezza query/ gene	Contig	Posizione nel contig	Fenotipo	N° identificativo	Note
blaKPC-3	998.866.213.152	882/882	tig00000003 len=191678 reads=535 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	156653..157533	amoxicillin, amoxicillin+clavulanic acid, ampicillin, ampicillin+clavulanic acid, aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacillin, piperacillin+tazobactam, ticarcillin, ticarcillin+clavulanic acid	HM769262	Class A; Group 2f;
blaSHV-182	994.192.799.071	861/861	tig00000001 len=5326288 reads=11537 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	4345520..4346378	unknown beta-lactam	KP050489	Class A

Altri geni di resistenza identificati in questo genoma codificano meccanismi di resistenza per classi di antibiotici diverse [Tabella 9].

La resistenza ai fluorochinoloni è determinata da *aac(6)-Ib-cr* mentre, i geni *OqxA* e *OqxB*, associati in un operone, codificano per proteine di fusione di membrana e conferiscono resistenza a cloramfenicolo, acido nalidixico,

trimetoprim e sali quaternari di ammonio come cloruro di benzalconio e di cetilpiridinio.

OqxA e *OqxB* sono stati per la prima volta identificati nel plasmide pOLA52 di *E. coli* e sono localizzati a livello cromosomico su *K. pneumoniae 533863* (contig 1).

Il gene *aac(6')-Ib-cr*, invece, originariamente è individuato sull'integrone di classe I In37::ISCR1::qnrB6 di *K. pneumoniae* M7943. Nel genoma in esame lo ritroviamo a livello del contig 3, ovvero a livello plasmidico.

Per quanto riguarda gli aminoglicosidi è presente il gene *aac(6')-Ib*, indicato anche come *aacA4*, nel contig 3 mentre, per la fosfomicina abbiamo identificato il gene *fosA* a livello del contig 1.

***Tabella 9**. Geni di resistenza verso classi di antibiotici diverse dai β-lattamici*

Gene di resistenza	Identità	Lunghezza query/ lunghezza gene	Contig	Posizione nel contig	Fenotipo	N° identificativo
aac(6')-Ib-cr	994.219.653.179	519/519	tig00000003 len=191678 reads=535 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	5587..6105	ciprofloxacin	EF636461
OqxA	99.574.829.932	1176/1176	tig00000001 len=5326288 reads=11537 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	535824..536994	chloramphenicol, benzylkonium chloride, cetylpyridinium chloride, nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim	EU370913

OqxB	996.511.259.118	3153/3153	tig00000001 len=5326288 reads=11537 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	537017..540158		
aac(6')-Ib	100.0	606/606	tig00000003 len=191678 reads=535 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	172744..173349	amikacin, tobramycin	M21682
fosA	992.682.926.829	410/420	tig00000001 len=5326288 reads=11537 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	2454751..2455160	fosfomycin	ACWO01000079

Tra i geni che subiscono mutazioni puntiformi ritroviamo *ompk35, ompk36* e *ompk37*. Questi codificano per porine di membrana, ovvero proteine canale responsabili della selettività nel trasporto di molecole di varie dimensioni.

Le mutazioni a livello di questi geni conferiscono fenotipi di resistenza nei confronti di carbapenemi e cefalosporine. Ad esempio, la mutazione da GCT a TCT a livello di *ompk36* comporta la sintesi di una serina al posto di un'alanina e, conseguentemente, resistenza ai carbapenemi.

3.4.1.4. MLST

L'analisi MLST del genoma di *Kp-533863* ha classificato i sette geni housekeeping come segue:

- gapA_54

- infB_3
- mdh_380
- pgi_1
- phoE_1
- rpoB_1
- tonB_79

Questi geni corrispondono al sequence type ST512, appartenente al clonal group CG258 di cui fanno parte anche ST258 e ST1879.

3.4.1.5. VirulenceFinder

VirulenceFinder permette di evidenziare i geni di virulenza presenti sul genoma in esame.

A livello del contig 1 è presente *iutA*. Si tratta di un gene di *E. coli* codificante per il recettore dell'aerobactina ferrica, localizzato sul plasmide *IncFI ColV3-K30*. È responsabile della regolazione del trasporto degli ioni ferro attraverso la membrana.

Nel contig 3 ritroviamo, invece, il gene *TraT*, inizialmente individuato in *E. coli* dove codifica per una proteina della membrana esterna incaricata di impedire coniugazioni batteriche improduttive. Anche questo gene è a localizzazione plasmidica.

3.4.2. K. pneumoniae PS-24

Analizzando il genoma del ceppo PS-24 vediamo che è costituito da 11 contig [Tabella 10]. Le loro dimensioni suggeriscono che, ad accezione del 15, sono tutti relativi al cromosoma batterico. La conferma deriva dalla successiva analisi con BLAST.

***Tabella 70**. Codici identificativi dei contig e relative caratteristiche*

Contig	Dimensione	Reads	Circolarizzazione
1	1830310 basi	6578	No
3	1612198 basi	5479	No
5	493361 basi	1594	No
7	444509 basi	1365	No
9	294284 basi	1088	No
11	266691 basi	1008	No
13	330291 basi	950	No
15	110742 basi	194	Si
16	131891 basi	354	No
19	1863 basi	3	No
21	5522 basi	3	No

3.4.2.1. PlasmidFinder

Sono presenti gli stessi tre gruppi di incompatibilità individuati in *Kp-533863* [Tabella 11]. Ritroviamo IncFIB(pQil) e IncFII(K) nel contig 15, a livello plasmidico, mentre IncFIB(K) nel contig 1, a livello cromosomico. La presenza

di questa proteina nel cromosoma batterico potrebbe suggerire una eventuale integrazione di un plasmide che, quindi, potrebbe essere in grado di comportarsi da episoma. Sono però necessarie ulteriori analisi per confermare questa ipotesi.

***Tabella 81**. Gruppi di incompatibilità in Kp-PS24*

Plasmide	Identità	Lunghezza query/ lunghezza gene	Contig	Posizione nel contig	N° identificativo
IncFIB(pQil)	100	740 / 740	tig00000015 len=110742 reads=194 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	71423..72162	JN233705
IncFIB(K)	98.57	560 / 560	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	692116..692673	JN233704
IncFII(K)	97.3	148 / 148	tig00000015 len=110742 reads=194 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	32182..32328	CP000648

3.4.2.2. BLAST

Il contig 15 è lungo 110 kb ma, analogamente al contig 3 del ceppo precedente, presenta una regione di sovrapposizione che ne permette la circolarizzazione.

Dopo averla rimossa, il plasmide presenta ancora il gene *repA* responsabile della replicazione e la sua dimensione risulta ridotta di 5 kb.

Il genoma di *Kp-PS24* è costituito, quindi, da un cromosoma di circa 5400 kb rappresentato da tutti i contig ad eccezione del 15, relativo al plasmide di circa 105 kb (contig 15). Questo, mostra una coverage del 99% e un'omologia del 99,36% con il già noto plasmide *pKPQIL* di *K. pneuomniae ST258* (NC_014016.1).

3.4.2.3. ResFinder

Il genoma del pulsotipo P2, a differenza del G1, è caratterizzato da una più vasta gamma di geni che determinano resistenza nei confronti dei β-lattamici [Tabella 12]. Infatti, oltre a bla_{KPC-3}, ritroviamo bla_{SHV-28}, $bla_{SHV-106}$, bla_{TEM-1B}, $bla_{CTX-M-15}$ e bla_{OXA-1}.

Il genotipo di resistenza ricalca quelli di *K. pneumoniae 533863* ma sono presenti geni aggiuntivi che codificano per β-lattamasi ($bla_{SHV-106}$, $bla_{CTX-M-15}$ e bla_{TEM-1B}).

Ad eccezione di bla_{KPC-3} che, trovandosi nel contig 15, è situato su un plasmide, tutti gli altri geni di resistenza sono a localizzazione cromosomica e si dividono tra il contig 1 ed il 3.

Solitamente i geni codificanti per TEM-1B, CTX-M-15 e OXA-1 si trovano co-localizzati su un plasmide assieme al gene *ant(3)'* per la resistenza agli aminoglicosidi e alla sequenza di inserzione IS26. Nel nostro caso, invece, si trovano a livello cromosomico e la distanza che intercorre tra TEM-1B e OXA-1 è di gran lunga maggiore (110 kb circa).

***Tabella 129**. Geni di resistenza verso i β-lattamici in K. pneumoniae PS-24*

Gene di resistenza	Identità	Lunghezza query/ lunghezza gene	Contig	Posizione nel contig	Fenotipo	N° identificativo	Note
blaKPC-3	996.598.639.456	882/882	tig00000015 len=110742 reads=194 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=yes	44459..45337	amoxicillin, amoxicillin+clavulanic acid, ampicillin, ampicillin+clavulanic acid, aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacillin, piperacillin+tazobactam, ticarcillin, ticarcillin+clavulanic acid	HM769262	Class A; Group 2f;
blaSHV-106	99.6515679443	861/861	tig00000003 len=1612198 reads=5479 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	1378201..1379059	amoxicillin, ampicillin, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, piperacillin, ticarcillin	AM922307	Class A
blaTEM-1B	996.515.679.443	861/861	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	609187..610044	amoxicillin, ampicillin, cephalothin, piperacillin, ticarcillin	AY458016	Class A
blaSHV-28	996.515.679.443	861/861	tig00000003 len=1612198 reads=5479 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	1378201..1379059	unknown beta-lactam	AF299299	Class A

blaCTX-M-15	994.292.237.443	876/876	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	606903..607773	amoxicillin, ampicillin, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, piperacillin, ticarcillin	AY044436	Class A
blaOXA-1	995.186.522.262	831/831	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	729102..729928	amoxicillin, amoxicillin+clavulanic acid, ampicillin, ampicillin+clavulanic acid, cefepime, piperacillin, piperacillin+tazobactam	HQ170510	Class D; OXA-1-like; Alternative name blaOXA-30;

Anche per i geni di resistenza verso classi di antibiotici diverse dai β-lattamici rileviamo una parziale corrispondenza con il genoma del pulsotipo G1 [Tabella 13]. Ritroviamo, infatti, i geni *OqxA*, *OqxB*, *aac(6)-Ib-cr* e *fosA*. In aggiunta, però, vengono evidenziati anche geni di resistenza al sulfametoxazolo (*sul2*), al trimetoprim (*dfrA14*), alla streptomicina (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), alla gentamicina e trobamicina (*aac(3)-IIa*), alla doxiciclina e tetraciclina (*tetA*). Inoltre, è presente anche un altro gene di resistenza alla ciprofloxacina, *qnrB1*.

Ad eccezione dei geni *OqxA* e *OqxB* localizzati sul contig 16 e del gene *fosA* sul contig 5, tutti gli altri geni si trovano sul contig 1. Ad ogni modo sono tutti a localizzazione cromosomica.

Il gene *aph(3'')-Ib*, indicato anche come *strA*, deriva dal plasmide *pSTR1* di *Shigella flexneri* mentre *tetA* dal plasmide *pRAS1* di *Aeromonas salmonicida*.

***Tabella 103**. Geni di resistenza ad antibiotici appartenenti a classi diverse dai β-lattamici*

Gene di resistenza	Identità	Lunghezza query/ lunghezza gene	Contig	Posizione nel contig	Fenotipo	N° identificativo
aac(6')-Ib-cr	998.333.333.333	600/600	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	730055..730653	ciprofloxacin	DQ303918
qnrB1	99.3798449612	645/645	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	715094..715734	ciprofloxacin	DQ351241
OqxA	98.1292517007	1176/1176	tig00000016 len=131891 reads=354 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	126288..127455	chloramphenicol, benzylkonium chloride, cetylpyridinium chloride, nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim	EU370913
OqxB	982.873.453.853	3153/3153		123121..126264		
sul2	99.387.254.902	816/816	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	612455..613265	sulfamethoxazole	AY232670
fosA	992.857.142.857	420/420	tig00000005 len=493361 reads=1594 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	427176..427594	fosfomycin	ACWO01000079
dfrA14	991.561.181.435	474/474	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	597860..598329	trimethoprim	KF921535
aph(3'')-Ib	996.268.656.716	804/804	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	611594..612394	streptomycin	AF321551

aac(3)-IIa	996.515.679.443	861/861	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	592855..593712	gentamicin, tobramycin	CP02355
tet(A)	99.75	1200/1200	tig00000001 len=1830310 reads=6758 class=contig suggestRepeat=no suggestCircular=no	723938..725134	doxycycline, tetracycline	AJ517790

Le mutazioni puntiformi anche in questo caso sono a carico del gene *ompk36* e determinano resistenza alle cefalosporine. Ad ogni modo, però, l'effettiva azione di questi geni sul fenotipo è oggetto di uno studio ancora in corso di svolgimento.

3.4.2.4. MLST

L'analisi MLST del genoma di *Kp-PS24* ha classificato i sette geni housekeeping come segue:

- gapA_214
- infB_1
- mdh_2
- pgi_52
- phoE_1
- rpoB_1
- tonB_7

Questi geni appartengono al *sequence type* ST307.

3.4.2.5. VirulenceFinder

I geni di virulenza individuati nel genoma relativo al pulsotipo P2 sono quattro, di cui due corrispondono a quelli del pulsotipo G1: *iutA* a livello cromosomico (contig 3) e *TraT* a livello plasmidico (contig 15).

In aggiunta sono presenti due geni di *E. coli*: *fyuA* ed *irp2* nel contig 13. Il primo codifica per un recettore dei siderofori mentre, il secondo, per un peptide ad elevato peso molecolare impegnato nella sintesi proteica non ribosomiale.

4. DISCUSSIONE

Il problema della costante comparsa di microrganismi resistenti ai carbapenemi risiede nel fatto che questi farmaci, fino agli anni ’90, rappresentavano l’unica opzione disponibile per il trattamento di infezioni sostenute da *Enterobacteriaceae* in grado di sintetizzare β-lattamasi a spettro esteso. Occupa una posizione di rilievo *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi, in quanto la frequenza con cui causa infezioni (molto spesso letali) e la trasmissione dei determinanti di resistenza situati su elementi genetici mobili è estremamente elevata *(Gupta et al., 2011)*. In particolare, dal 2001 ad oggi, KPC-Kp ha raggiunto un tasso di diffusione allarmante in tutti gli Stati Uniti ed in alcuni paesi europei, tra cui l’Italia (*Conte et al., 2016*).

La principale difficoltà riscontrata nel trattamento delle infezioni sostenute da questi batteri risiede nel disporre di farmaci attivi nei loro confronti. Infatti, non di rado, le specie CRE presentano resistenza, oltre che ai carbapenemi, anche ad altre classi di antibiotici come aminoglicosidi e fluorochinolini (*Morill et al., 2015*).

Per questo motivo sono stati riesumati farmaci più datati e caduti in disuso, come la colistina. Il suo utilizzo, anche in combinazione con altri principi attivi, inizialmente ha rappresentato l’unica opzione terapeutica fruibile. La

conseguenza diretta a questo aumento nell'impiego della colistina si riflette nella comparsa di ceppi con fenotipo resistente (*Duin and Doi, 2015*).

Sono stati condotti numerosi studi per monitorare la situazione nel nostro Paese e, in letteratura, è possibile trovare svariati dati che sostengono un incremento dei casi di sepsi promosse da Kp-KPC resistenti alla colistina. Tra il 2010 ed il 2013, ad esempio, il 95% degli isolati da emocolture provenienti da cinque ospedali universitari italiani, presentava questo fenotipo (*Tumbarello et al., 2015*).

I dati raccolti in questo studio sono in linea con quelli esposti dallo studio di Brescini e collaboratori (*Brescini et al., 2019*) in quanto confermano un trend decrescente della resistenza alla colistina. Infatti, nel 2019, nella regione Marche si è assistito ad un'importante riduzione del fenotipo di resistenza a questo antibiotico rispetto agli anni precedenti: solo l'11,11% degli isolati ha mostrato un valore di MIC superiore ai 2 mg/L a fronte del 36,36% del 2018. Questo può avere varie motivazioni.

In primis il trend in diminuzione può derivare dal cambiamento della metodica utilizzata per la determinazione della MIC. Negli ultimi anni, infatti, le tecniche automatizzate come il Vitek, che hanno dimostrato di sovrastimare i valori di MIC, sono state sostituite da metodiche tradizionali come la microdiluizione in brodo. La minor sensibilità e accuratezza della prima metodica potrebbe aver

falsato alcuni risultati determinando una sproporzione nel tasso di resistenza registrata.

D'altra parte, la messa a punto di nuove combinazioni di farmaci estremamente efficienti, ha scavalcato l'uso della colistina. Il minor impiego di questo farmaco è andato di pari passo con la riduzione della frequenza dei fenotipi resistenti, probabilmente a causa della minor pressione selettiva imposta da questa diminuzione.

Dal 2016, infatti, è stato commercializzato il ceftazidime-avibactam, costituito da una cefalosporina di terza generazione e da un nuovo inibitore delle β-lattamasi. L'efficacia di quest'ultimo è stata ampiamente analizzata in vitro tramite checkerboard, affermando che la sua attività è concentrazione dipendente. La sua azione ottimale si ottiene ad una concentrazione di 4 mg/L con conseguenti valori di MIC al ceftazidime inferiori a 4 mg/L (indice di sensibilità) (*Berkhout et al., 2015*). Il ceftazidime-avibactam rappresenta un farmaco innovativo perché, il suo inibitore non β-lattamico, ha la capacità di legare la KPC disattivandone l'azione (*Van Duin and Bonomo, 2016*) e dal momento della sua commercializzazione è stato ampiamente utilizzato per il trattamento delle infezioni da CPE (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae) grazie alle sue ottime proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche (*Yahav et al., 2020*).

Parallelamente alla commercializzazione dell'avibactam è comparso anche il primo farmaco costituito da un carbapenemico e da un inibitore delle β-lattamasi: il meropenem-vaborbactam (Vaborem), approvato dall'EMA a novembre 2018. A febbraio 2020, è stato dato il via libera anche alla seconda combinazione costituita da imipenem e relebactam (Recarbrio). La presenza di entrambi gli inibitori delle β-lattamasi in grado di inibire l'azione della KPC determina un significativo aumento dell'azione dei due carbapenemi nelle infezioni sostenute da *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (*Zhanel et al., 2017*).

La terza ragione è rappresentata dall'affermarsi di nuovi ceppi di Kp-KPC.

Il clone maggiormente diffuso a livello globale è il CG258, definito come clone internazionale ad alto rischio. Ne fa parte il sequence type ST512 che, fino al 2013, ha rappresentato il clone di primaria importanza in tutta Italia, raggiungendo percentuali di incidenza del 42% (*Conte et al., 2016*). Negli ultimi anni, però, è comparso ed ha iniziato ad affermarsi un nuovo clone: l'ST307, descritto per la prima volta nel 2008 negli Stati Uniti (*Villa et al., 2017*). Già a marzo 2014, la sua percentuale di incidenza in cinque ospedali di Palermo ammontava al 43,75% (*Geraci et al., 2015*) e, tra il 2011 ed il 2015 ad Ancona, su 107 campioni raccolti 97 erano riconducibili al ST512 (91%) e 10 al ST307 (9%). In particolare, nel 2014 questo clone ha determinato mini-

outbreak in diversi reparti a partire dall'isolamento su un'unica paziente (*Brescini et al., 2019*).

Anche i dati raccolti in questo studio sostengono un cambiamento della popolazione di Kp-KPC dal clone ST512 al ST307. Se si considera l'intero periodo 2014-2019, ST512 risulta essere nettamente prevalente, sia in Ancona che a Fano. Tra il 2018 ed il 2019, però, si evidenzia una notevole riduzione della sua circolazione, infatti il pulsotipo corrispondente[62] passa dal 63,63% al 16,66% di incidenza. In particolare, a Fano nell'ultimo anno di studi viene rilevato un outbreak causato da ST307, che raggiunge un'incidenza del 58,33% a differenza del ST512 che conta solo due casi su dodici. Il drastico calo del ST512 in favore del ST307 nel corso di un solo anno (dal 2018 al 2019), potrebbe suggerire una maggiore capacità infettiva o di adattamento di quest'ultimo. Studi precedenti hanno dimostrato che i pazienti che lo hanno contratto hanno manifestato un tasso di mortalità maggiore rispetto a quelli infettati da cloni diversi e, la presenza di geni e fattori di virulenza ulteriori a bla_{KPC} contribuiscono al maggiore potenziale patogeno di ST307 e alla sua elevata capacità di adattarsi sia all'ambiente ospedaliero che all'uomo. Questo clone, infatti, inizialmente era noto solo per la produzione della β-lattamasi a spettro esteso CTX-M-15. Successivamente ha acquisito il gene codificante per

[62] Vengono considerati i pulsotipi G1, G2 e G3 in quanto, differendo per una singola banda, indicano ceppi strettamente correlati che con elevata probabilità corrispondono allo stesso sequence type.

la carbapenemasi KPC (*Villa et al., 2017*). Anche i nostri risultati hanno confermato un maggior carico di determinanti di resistenza del clone ST307 rispetto al clone ST512: quest'ultimo, infatti, non possiede i determinanti di resistenza bla_{SHV-28}, $bla_{SHV-106}$, bla_{TEM-1B}, $bla_{CTX-M-15}$ e bla_{OXA-1}. Allo stesso modo, ST307 possiede fattori di virulenza accessori (*fyuA ed irp2*) non presenti nel clone ST512.

Da questo studio viene confermato l'elevato tasso di circolazione di ST512 e la sua capacità di diffusione in diversi ospedali (Ancona, Pesaro e Fano) rimanendo invariato. Il pulsotipo G1, maggiormente rappresentato in questo studio e rappresentante del clone ST512, è identico al pulsotipo A identificato da Brescini e collaboratori (*Brescini et al., 2019*). Questo risultato dimostra che un clone ST512 è stabilmente diffuso nell'azienda "Ospedali Riuniti" di Ancona dal 2011 e che nel corso degli anni non ha subito mutazioni importanti che ne hanno determinato l'evoluzione. Nell'ultimo periodo di studio, però, la sua percentuale di diffusione è diminuita a favore di diversi isolati con pulsotipi diversi.

Per quanto riguarda ST307, invece, la sua variabilità è molto più spiccata e diversi studi precedenti hanno dimostrato un ampio tasso di mutazione in termini genetici all'interno di questo sequence type (*Villa et al., 2017*). Il ceppo circolante ad Ancona nel 2014 era caratterizzato dal gene codificante per KPC-

2 (*Brescini et al., 2019*) mentre, quello identificato a Fano nel 2019, per KPC-3. Questo suggerisce che i due ceppi isolati nella regione Marche non siano correlati tra loro e abbiano un'origine epidemiologica diversa. Non è inoltre da escludere che gli altri pulsotipi identificati in questo studio possano appartenere al ST307. Ulteriori analisi ed esperimenti saranno necessari per confermare questa possibilità.

In letteratura, il gene bla_{KPC-3} viene descritto come la variante più comune nel nostro Paese (*Geraci et al., 2015*), ma la sua distribuzione ricopre una posizione di rilievo anche a livello globale. Questo è determinato dalla localizzazione del gene sul trasposone *Tn4401*, elemento genetico fiancheggiato dalle sequenze di inserzione *ISKpn6* e *ISKpn7*, che contribuiscono ad aumentarne la diffusione anche tra ceppi appartenenti a specie batteriche diverse (*Wang et al., 2014*). Entrambi i ceppi sequenziati in questo lavoro possedevano un *Tn4401* che portava il gene bla_{KPC-3}.

Il plasmide relativo al gene *bla* di Kp-533863, presenta il match migliore (93% di coverage e 99,63% di identità) con il plasmide *pBK32179* dell'omonimo ceppo di *K. pneumoniae* (JX430448.1.) In particolare, una delle regioni di corrispondenza è quella relativa alla struttura del trasposone *Tn4401*, con il gene bla_{KPC-3} fiancheggiato dalle due caratteristiche sequenze di inserzione. Questo plasmide, porta anche geni codificanti per pompe di efflusso per

l'arsenico (*ArsA, ArsB*) e geni di resistenza verso questo semi-metallo (*ArsH*). *pBK32179*, però, è stato originariamente isolato da *K. pneumoniae ST258* ed era caratterizzato dal gene bla_{KPC-2} e dal gruppo di incompatibilità IncFII(K), assenti invece nel plasmide oggetto di studio (*Chen et al., 2013*). Inoltre, non presentava i geni *aac(6')-Ib-cr* e *aac(6')-Ib* per la resistenza a ciprofloxacina e aminoglicosidi. Questo suggerisce una distanza filogenetica tra i due.

In aggiunta, il gruppo di incompatibilità riscontrato, FIB(K), è indicato da Villa e collaboratori (*Villa et al., 2017*) come caratteristico del già noto plasmide *pKPN3* di *K. pnuemoniae* ST258 (NC_009649.1) che condivide con il plasmide di *Kp-533863* il gene *aac(6')-Ib* per la resistenza ad amikacina e trobamicina.

Per quanto riguarda, invece, il plasmide del ceppo Kp-PS24, una coverage del 99% e un'omologia del 99,36% si ha con il già noto *pKpQIL* (NC_014016.1). Anche in questo caso troviamo corrispondenza a livello della regione codificante per il gene bla_{KPC-3}. Sono individuabili il trasposone *Tn4401* e le due sequenze di inserzione caratteristiche, così come i geni per le trasposasi e le resolvasi. Inoltre, la presenza del gruppo di incompatibilità FII(K) lo cataloga come replicone del plasmide *pKpQIL* (*Villa et al., 2017*). Questo plasmide, però, è stato originariamente isolato da *K. pneumoniae ST258* (*Leavitt et al., 2010*) mentre in questo studio è stato evidenziato su un ST307. Questo denota la capacità di trasferimento del plasmide anche tra ceppi molto diversi tra loro.

Nel nostro Paese, quindi, a differenza degli anni precedenti in cui quasi la totalità degli isolati di KPC-Kp apparteneva al clonal group CG258 (*Conte et al., 2016*), assistiamo ad un'evoluzione policlonale della popolazione batterica in esame. In particolare, l'affermarsi del ST307, con il suo elevato tasso di mutazione ed infettività, richiede considerevole attenzione. È importante continuare a monitorarne la diffusione sia nelle zone in cui è già stato isolato che in quelle limitrofe per poterne tracciare l'evoluzione epidemiologica.

Inoltre, anche se in questo studio non sono stati evidenziati fenotipi di resistenza al ceftazidime-avibactam, in letteratura sono già presenti elaborati con dati che confermano le prime resistenze sia nei suoi confronti, che verso il meropenem-vaborbactam (*Gaibani et al., 2020*).

Quindi, affinché l'efficacia terapeutica di queste nuove combinazioni di farmaci venga preservata, è necessario un utilizzo consapevole e scrupoloso al fine di evitare la comparsa sempre più consistente di microrganismi con fenotipo di resistenza nei loro confronti.

5. BIBLIOGRAFIA

- Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, et al. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam Combination in In Vitro Checkerboard Assays. 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 59:1138 –1144. DOI: 10.1128/AAC.04146-14

- Biswas S, Burnel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012; DOI: 10.1586/eri.12.78

- Brescini L, Morroni G, Valeriani C, et al. Clinical and epidemiological characteristicsof KPC-producingKlebsiella pneumoniaefrom bloodstream infections in a tertiaryreferral center in Italy. *Infectious Diseases.* 2019; 19:611. DOI: 10.1186/s12879-019-4268

- Bush K. Past and Present Perspectives on β-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother. 2018;* 62:e01076-18. DOI: 10.1128/AAC.01076-18 2018

- Chen L, Chavda KD, Melano RG, et al. Complete sequence of a bla(KPC-2)-harboring IncFII(K1) plasmid from a Klebsiella pneumoniae sequence type 258 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(3):1542-5. DOI: 10.1128/AAC.02332-12

- Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of Klebsiella pneumoniae. *Microbiol Spectrum* 4(1):UTI-0005-2012. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.
- Conte V, Monaco M, Giani T, et al. 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
- Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 831–838. DOI: 10.1111/1469-0691.12655
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-data
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. http://www.eucast.org
- Gaibani P, Re MC, Campoli C, et al. Bloodstream infection caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae resistant to ceftazidime/avibactam:

epidemiology and genomic characterization. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26(4):516.e1-516.e4. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.11.011

- Geraci DM, Bonura C, Giuffrè M, et al. Is the monoclonal spread of the ST258, KPC-3-producing clone being replaced in southern Italy by the dissemination of multiple clones of carbapenem-nonsusceptible, KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae? *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21:e15–e17. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.08.022
- Gupta N, Limbago BM, Patel JB, et al. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. 2011. *Clinical Infectious Diseases.* 2011; 53(1):60–67. DOI: 10.1093/cid/cir202
- Havenga B, Ndlovu T, Clements T, et al. Exploring the antimicrobial resistance profiles of WHO critical priority list bacterial strains. *BMC Microbiology*. 2019; 19:303. DOI: 10.1186/s12866-019-1687-0
- Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, et al. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid p KPQIL in the epidemic Klebsiella pneumoniae sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(10): 4493-6. DOI: 10.1128/AAC.00175-10
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drugresistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin*

Microbiol Infect. 2012; 18:268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

- Morill HJ, Pogue JM, Kaye KS, et al. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Open Forum Infectious Diseases*. 2015. DOI: 10.1093/ofid/ofv050

- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol*. 2007; 20(3): 440–458. DOI: 10.1128/CMR.00001-07
- Sharma R, Park TE, Moy S. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/β-Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. *Clin Ther*. 2016; 38(3):431-44. DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.01.018.

- Shields RK, Potoski BA, Haidar G, et al. Clinical Outcomes, Drug Toxicity, and Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Among Patients Treated for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Clinical Infectious Diseases. 2016;* 1615–1618. DOI: 10.1093/cid/ciw636

- Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018; 78:675–692. DOI: 10.1007/s40265-018-0902-x

- Tumbarello M, Trecharichi EM, De Rosa FG, et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70: 2133 –2143 DOI: 10.1093/jac/dkv086

- Van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β-Lactam/β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Clinical Infectious Diseases. 2016;* 234–241. DOI: 10.1093/cid/ciw243

- Van Duin D, Doi Y. Commentary: Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Are We at the End of the Road? *Journal of Clinical Microbiology*. 2015. DOI: 10.1128/JCM.01399-15

- Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenem mase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017; 4:460–469. DOI: 10.1080/21505594.2016.1222343

- Van Duin D, Perez F, Rudin SD, et al. Surveillance of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7):4035-41. DOI: 10.1128/AAC.02636-14

- Villa L, Feudi C, Fortini D, et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing Klebsiella pneumoniae ST307 clone. *Microbial Genomics*. 2017; 3. DOI: 10.1099/mgen.0.000110

- Wang D, Hou W, Chen J, et al. Characterization of the bla KPC-2 and bla KPC-3 genes and the novel bla KPC-15 gene in Klebsiella pneumoniae. *Journal of medical microbiology.* 2014. 63,981–987. DOI: 10.1099/jmm.0.073841-0

- Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, et al. New β-Lactam-β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Nov 11; 34(1):e00115-20. DOI: 10.1128/CMR.00115-20

- Zasowski EJ, Rybak JM, Rybak MJ. The β-Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(8):755-70. DOI: 10.1002/phar.1622

- Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, et al. Imipenem–Relebactam and Meropenem–Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-b-Lactamase Inhibitor Combinations. *Springer Nature.* 2017. 78:65–98. DOI: 10.1007/s40265-017-0851-9