



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELLA TERRA**

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata*

***Klebsiella pneumoniae* e *bla*<sub>OXA-48</sub>, l'attacco del clone:  
epidemiologia e caratterizzazione di ceppi isolati presso gli  
“Ospedali Riuniti”, Ancona**

***Klebsiella pneumoniae* and *bla*<sub>OXA-48</sub>, the clone attack:  
epidemiology and characterization of isolates collected from  
“Ospedali Riuniti”, Ancona**

Tesi di Laurea Magistrale di:

**Nunzi Ilaria**

Relatore:

**Dott. Morroni Gianluca**

**Sessione Straordinaria (Febbraio)**

**Anno Accademico 2021-2022**

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	5
<i>1.1. Klebsiella pneumoniae</i> .....	9
<i>1.2. Carbapenemi</i> .....	11
<i>1.2.1. Resistenza ai carbapenemi</i> .....	13
<i>1.2.2. Classificazione carbapenemasi</i> .....	15
<i>1.2.2.1. Carbapenemasi di classe A</i> .....	18
<i>1.2.2.2. Carbapenemasi di classe B</i> .....	20
<i>1.2.2.3. Carbapenemasi di classe D</i> .....	22
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	25
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	26
<i>3.1. Ceppi batterici</i> .....	26
<i>3.2. GeneXpert</i> .....	26
<i>3.3. Saggi di amplificazione</i> .....	27
<i>3.4. Tipizzazione</i> .....	28
<i>3.4.1. PFGE</i> .....	29
<i>3.4.2. MLST</i> .....	33
<i>3.5. Antibiotici</i> .....	33
<i>3.6. Test di sensibilità</i> .....	33
<i>3.7. Estrazione DNA totale</i> .....	36

3.7.1. Elettroforesi.....	37
3.7.2. Qubit 4.....	38
3.8. Sequenziamento ed analisi di sequenza.....	40
3.8.1. Oxford Nanopore MinION.....	40
3.8.1.1. Flow cell.....	41
3.8.1.2. Rapid Barcoding Sequencing kit.....	43
3.8.2. Illumina Miseq.....	47
3.8.2.1. Illumina DNA Prep.....	50
3.8.3. Analisi di sequenza.....	54
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>56</b>
4.1. Saggi di amplificazione.....	56
4.2. Tipizzazione.....	56
4.3. Determinazione della MIC.....	58
4.4. Sequenziamento ed analisi di sequenza.....	59
4.4.1. MLST.....	59
4.4.2. PlasmidFinder.....	60
4.4.2.1. Ricostruzione e confronto tra plasmidi.....	61
4.4.3. ResFinder.....	66
4.4.4. VirulenceFinder.....	70
4.4.5. CSIPhylogeny.....	70

<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>73</b>
<b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUZIONE

Nel 1928 la scoperta della penicillina ha determinato l'inizio dell'era antibiotica e un conseguente cambiamento radicale nella medicina. Grazie a queste nuove molecole è stato possibile contrastare numerose infezioni che negli anni precedenti si erano rivelate letali.

Alcuni batteri, però, hanno dimostrato di essere preparati a contrastare le numerose sfide poste da queste nuove molecole affermandosi come ceppi antibiotico-resistenti. Anzi, come riportato nel rapporto di sorveglianza del ECDC (*European Centre for Disease prevention and Control*), alcuni ceppi possedevano i geni per la resistenza agli antibiotici prima della loro scoperta. Il motivo risiede nel fatto che la resistenza agli antimicrobici è un fenomeno naturale dovuto a mutazioni di geni o acquisizione di geni per diffusione orizzontale.

Inizialmente lo sviluppo e l'acquisizione di antibiotico-resistenza non sono stati visti come un problema perché potevano essere facilmente aggirati con le nuove sostanze disponibili e in via di sviluppo.

Purtroppo, negli anni c'è stato un uso improprio degli antibiotici sia in ambito clinico, che veterinario, che industriale che ha favorito l'accelerazione dello sviluppo e della diffusione dei geni che conferiscono resistenza. Di conseguenza si fa sempre più fatica a trovare molecole a cui i microrganismi

risultino sensibili, fino ad arrivare al fenomeno della pan-resistenza, vale a dire la non sensibilità a qualsiasi antibiotico disponibile (*Jim O'Neill, 2016*).

Ci si trova ad affrontare un nemico con un arsenale in gran parte esaurito.

I ceppi multi-resistenti o MDR (multi-drug resistant), come indicato dal ECDC, sono batteri caratterizzati dall'insensibilità acquisita verso almeno un farmaco di tre differenti categorie di agenti antimicrobici.

Negli ultimi decenni i batteri MDR stanno causando danni irreparabili sia sociali che economici. Nel rapporto di O'Neill è stato stimato che circa 700000 persone muoiono ogni anno a causa di infezioni da ceppi resistenti ai farmaci, ma questo numero è probabilmente sottostimato a causa della scarsità di sorveglianza e segnalazioni. Sulla base di questo scenario si prospetta che nel 2050 le morti per antibiotico resistenza potrebbero salire a 10 milioni ogni anno. A questo grave problema sociale è direttamente collegato quello economico, come riportato dal *Center for Disease Control and Prevention* (CDC): i costi delle infezioni causate da batteri MDR raggiungono i 20 miliardi di dollari annui solo negli Stati Uniti, ai quali si sommano gli ulteriori 35 miliardi per perdita di produttività (*Van Duin and Doi, 2017*).

Nel 2017 la *World Health Organisation* (WHO) ha pubblicato una lista con i batteri resistenti agli antibiotici che hanno bisogno di un urgente sviluppo di

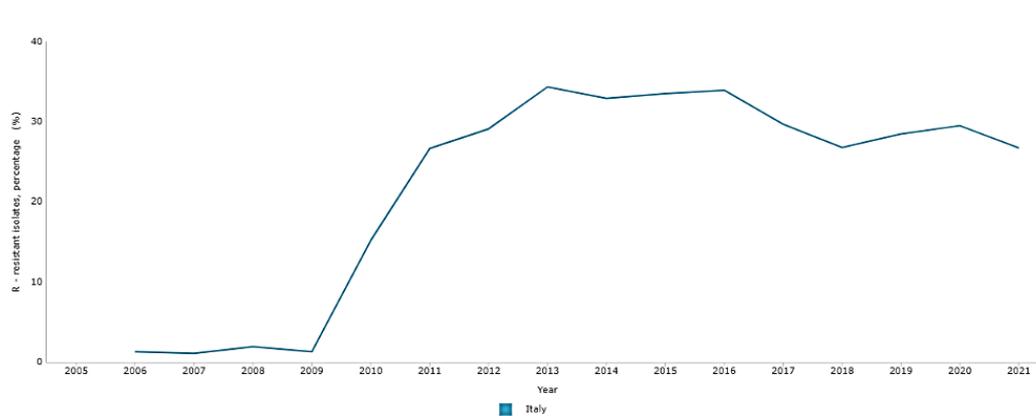
nuove sostanze efficaci. La lista è divisa in 3 categorie in base alla priorità di sviluppo di nuovi antibiotici: critica, alta e media. Nel primo gruppo ritroviamo *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, microrganismi accomunati dalla resistenza ai carbapenemi (<https://www.who.int/>).

Tra il 2020 ed il 2021 la percentuale di ceppi resistenti è aumentata per tutte le specie appartenenti al gruppo ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*).

In particolare, negli ultimi anni gli studi si sono concentrati maggiormente sulla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, alla quale appartiene il genere *Klebsiella*, in quanto responsabile di numerose infezioni sia ospedaliere che comunitarie. La loro pericolosità risiede nella resistenza ai carbapenemi che conferisce maggiore mortalità rispetto ai ceppi ad essi sensibili (*Van Duin and Doi, 2017*).

In particolare, *K. pneumoniae* è uno dei microrganismi che vengono sorvegliati ogni anno dal consorzio EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*), una rete di laboratori di microbiologia clinica istituita nel 2010 che ogni anno raccoglie dati sull'antibiotico-resistenza nei paesi europei. I risultati del report annuale 2021 di EARS-Net

dimostrano che nel corso degli anni la percentuale della resistenza ai carbapenemi in *K. pneumoniae* è sempre aumentata. Dal 2017 al 2018 la percentuale è rimasta invariata, mentre dal 2018 al 2019 è aumentata dell'8% e successivamente nel 2020 c'è stato un netto incremento, +31%. A seguire, nel 2021 ha continuato a salire fino ad un +20%.



**Figura 1:** Incidenza di isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi dal 2006 al 2021

**Fonte:** Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)-Annual Epidemiological Report 2021

Il principale meccanismo di resistenza dei ceppi CRE (*carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) è la sintesi di carbapenemasi, enzimi di differenti tipi in grado di idrolizzare le molecole con anello carbapenemico. È anche interessante sottolineare che la distribuzione dei tipi di carbapenemasi e l'incidenza dei ceppi produttori di carbapenemasi è variabile a seconda della collocazione geografica, pur tenendo in considerazione che i ceppi CP-CRE (*Carbapenemase-producing Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) ad oggi hanno raggiunto un'estensione globale (*Van Duin and Doi, 2017*).

## 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 pazienti deceduti per polmonite (Ashurst and Dawson, 2022).

È un batterio Gram negativo a forma di bastoncino, immobile, ossidasi negativo, catalasi positivo e anaerobio facoltativo. È dotato di una capsula polisaccaridica molto abbondante che gli conferisce un aspetto mucoso sul terreno di coltura e contribuisce alla sua virulenza in vivo, proteggendolo dalla fagocitosi e rendendolo resistente a molti meccanismi di difesa dell'ospite (<https://www.microbiologiaitalia.it/>).



**Figura 2:** A: Immagini di *K. pneumoniae* al microscopio elettronico a scansione (SEM)

B: *K. pneumoniae* su terreno di coltura selettivo MacConkey

**Fonte:** <https://www.microbiologiaitalia.it/>

*K. pneumoniae* è generalmente un commensale della mucosa respiratoria superiore e intestinale umana, ma si comporta da patogeno opportunista quando si trova in condizioni favorevoli, soprattutto in pazienti ospedalizzati o immunocompromessi, nei quali può causare infezioni severe a livello delle vie urinarie e respiratorie e nei casi più gravi anche a livello sistemico. Queste infezioni risultano molto difficili da trattare a causa delle numerose antibiotico-resistenze.

Oltre alla capsula, *K. pneumoniae* presenta diversi fattori di virulenza, tra cui i siderofori, vale a dire molecole che legano con alta affinità il ferro, necessario per la sopravvivenza del batterio, e i fattori di adesione, come le adesine fimbriali di tipo I e III. Esse sono coinvolte nella formazione del biofilm, un'aggregazione di batteri che si legano in maniera irreversibile ad un substrato, il quale può essere biotico o non, come ad esempio i cateteri urinari. Per questo *K. pneumoniae* è responsabile di moltissime UTIs (urinary tract infections) e CAUTIs (catheter-associated urinary tract infections), soprattutto in ambito ospedaliero, come riportato in tabella 1.

Un ulteriore problema, da non sottovalutare, legato al decorso di queste infezioni sono le condizioni dell'ospite: infatti, patologie come diabete mellito, ostruzione del tratto urinario e insufficienza renale cronica ne

influenzano negativamente la risoluzione favorendo la colonizzazione batterica (Clegg and Murphy, 2016).

**Tabella 1:** Incidenza delle infezioni urinarie causate da *K. pneumoniae*

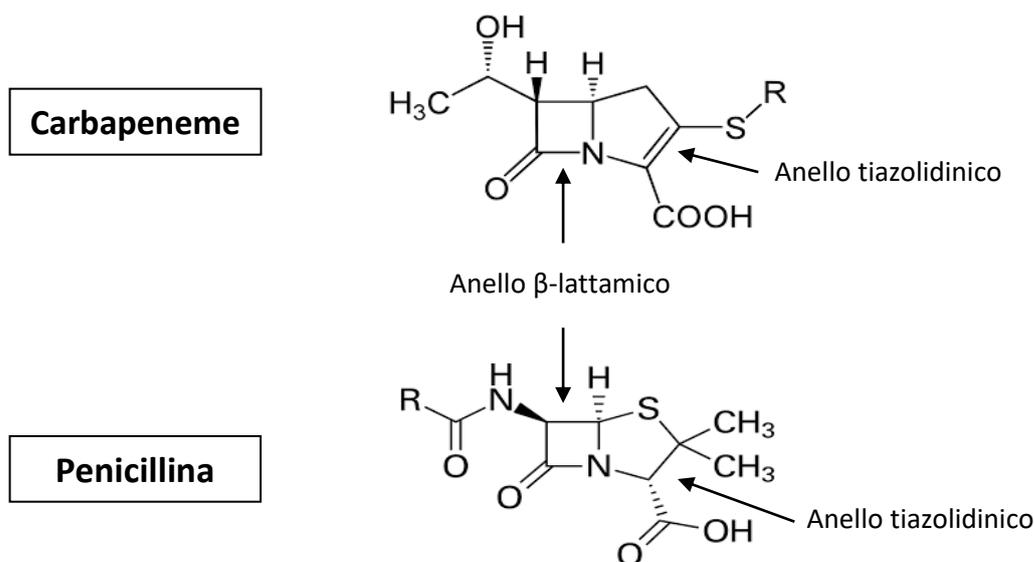
**Fonte:** Clegg and Murphy, 2016

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%

La pericolosità di *K. pneumoniae*, oltre all'espressione dei suoi numerosi fattori di virulenza, risiede anche nella sua capacità di acquisire antibiotico-resistenze. Ciò che preoccupa maggiormente è la resistenza ai carbapenemi dovuta alla produzione di carbapenemasi.

### **1.2 Carbapenemi**

I carbapenemi sono antibiotici  $\beta$ -lattamici ad ampio spettro d'azione attivi verso numerosi batteri sia Gram positivi che negativi. Hanno una struttura molto simile alle penicilline con alcune peculiari differenze: l'anello  $\beta$ -lattamico, differentemente dalle penicilline, lega un atomo di carbonio invece di un atomo di azoto al carbonio 1 e a livello dell'anello tiazolidinico manca un atomo di zolfo che è sostituito con un carbonio e un legame  $\pi$ .



**Figura 3:** Struttura chimica di un carbapeneme e una penicillina

Pur se la scoperta delle penicilline risale al 1928 ad opera di Alexander Fleming, solo nel 1976 è stato scoperto il primo  $\beta$ -lattamico con struttura carbapenemica, l'acido olivanico. Questo composto è prodotto naturalmente dal batterio Gram positivo *Streptomyces clavuligerus*, agisce come inibitore delle  $\beta$ -lattamasi ma non è stato utilizzato a causa della sua struttura chimica estremamente instabile. I primi inibitori delle  $\beta$ -lattamasi ad essere utilizzati per il commercio sono due analoghi simili all'acido olivanico, l'acido clavulanico e la tienamicina.

L'acido clavulanico è prodotto da *Streptomyces clavuligerus*, come l'acido olivanico, ed è stato il primo composto ad essere usato in ambito clinico contro le  $\beta$ -lattamasi.

La tienamicina è sintetizzata, invece, da *Streptomyces cattleya* ed è considerato il primo carbapeneme, infatti è stato il modello d'ispirazione per tutti gli altri  $\beta$ -lattamici (*Wallace KM et al., 2011*).

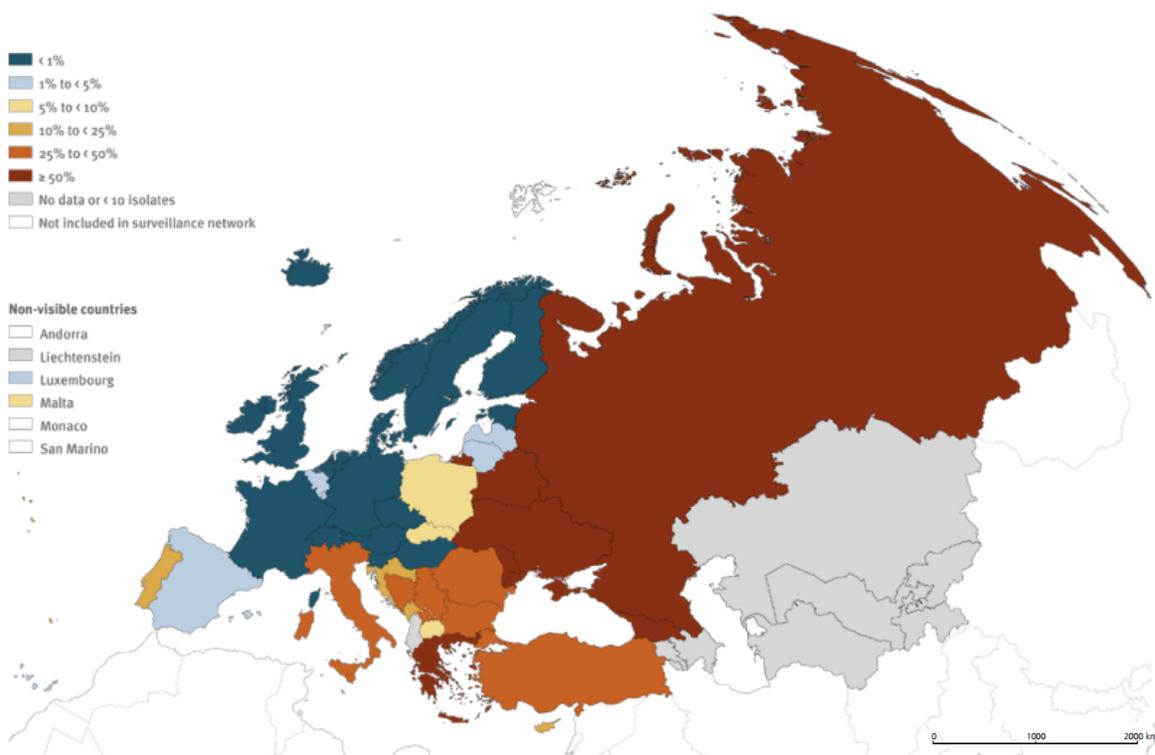
Attualmente sono approvati per l'uso clinico quattro farmaci che appartengono alla classe dei carbapenemi: Imipenem, Meropenem, Ertapenem e Doripenem.

Questa categoria di farmaci inibisce la crescita batterica interferendo con la sintesi della parete microbica legandosi alle PBPs (Penicillin binding proteins). Le PBPs sono enzimi che catalizzano le reazioni di transglicosilazione e transpeptidazione tra i tetrapeptidi dei monomeri di peptidoglicano e possiedono una spiccata affinità di legame con i  $\beta$ -lattamici che ne bloccano l'azione, impedendo la formazione dei legami crociati tra le catene lineari di peptidoglicano e di conseguenza determinando la lisi cellulare (*Wallace KM et al., 2011*).

### ***1.2.1 Resistenza ai carbapenemi***

Nel 1997 è stata descritta la prima resistenza ai carbapenemi negli Stati Uniti e poi nei tre anni successivi in maniera sporadica. Ma negli ultimi decenni la situazione è diventata preoccupante poiché la percentuale di ceppi resistenti è aumentata notevolmente: in particolare, dal 2006 al 2019 è incrementata di 7 volte rispetto agli anni precedenti (*EARS report 2019*).

Nel 2021, come riportato nel report annuale dell'EARS, 6 su 41 paesi presi in considerazione mostrano una percentuale di ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi maggiore del 50%, mentre altre 25 nazioni, tra cui l'Italia, hanno un tasso compreso tra il 25% e il 50% (EARS report 2022). [Figura 4]



**Figura 4:** Incidenza di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi nelle diverse aree geografiche.

**Fonte:** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data (ECDC).

La resistenza a questi antibiotici è per la maggior parte dei casi dovuta all'acquisizione di geni per la produzione di carbapenemasi, enzimi che possiedono la capacità di degradare l'anello carbapenemico e inattivare l'azione antibiotica dei carbapenemi. Oltre ai carbapenemi, questi enzimi

sono in grado di inibire la maggior parte degli antibiotici  $\beta$ -lattamici, rendendo i ceppi che li producono insensibili alla quasi totalità di molecole  $\beta$ -lattamiche.

Le carbapenemasi più comuni sono KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase), NDM (New-Dehli-metallo-  $\beta$ -lactamase), IMP (Imipenemase) e OXA-48 (Oxacillinase-48-like  $\beta$ -lactamase).

I determinanti di resistenza ai carbapenemi sono localizzati prevalentemente a livello plasmidico, di conseguenza la loro rapida diffusione è stata resa possibile da meccanismi di trasferimento genico orizzontale. Questo ha facilitato il trasferimento dei geni di resistenza anche tra specie diverse. Ad esempio, in pazienti ospedalizzati si è verificato il passaggio da *E. coli*, principale costituente della flora microbica intestinale, a *K. pneumoniae*, nota per frequenti colonizzazioni del tratto gastrointestinale.

Ad ogni modo, la trasmissione è stata agevolata anche dalla plasticità del genoma dei microrganismi interessati (*Clegg and Murphy, 2016*).

### ***1.2.2. Classificazione carbapenemasi***

Le origini delle  $\beta$ -lattamasi sono molto antiche, risalgono a milioni di anni fa e molto probabilmente derivano dalle PBPs, infatti è stata dimostrata la loro

similarità a livello di sequenza e la conservazione topologica del sito attivo (*Bush, 2018*).

Fino al 1990 le carbapenemasi erano considerate specie-specifiche, ma la loro diffusione e identificazione nei plasmidi ha cambiato questa visione e soprattutto, insieme al crescente utilizzo dei carbapenemi nella pratica clinica, ha determinato la propagazione dei geni che le codificano a livello globale.

Principalmente sono state rilevate nei batteri Gram negativi multi-resistenti appartenenti al gruppo EPA (*Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*) (*Diene and Rolain, 2014*).

Le carbapenemasi inizialmente sono state classificate in base alle caratteristiche del sito attivo: se il sito attivo è costituito da una serina esse sono dette serino carbapenemasi mentre se ci sono uno o più atomi di zinco, vengono denominate metallo  $\beta$ -lattamasi. Una classificazione più completa è quella che le divide a seconda dei gruppi funzionali (2, 1, 2d e 3), e di conseguenza in base all'attività nei confronti dei substrati e dei diversi inibitori utilizzati (*Bush, 2018*).

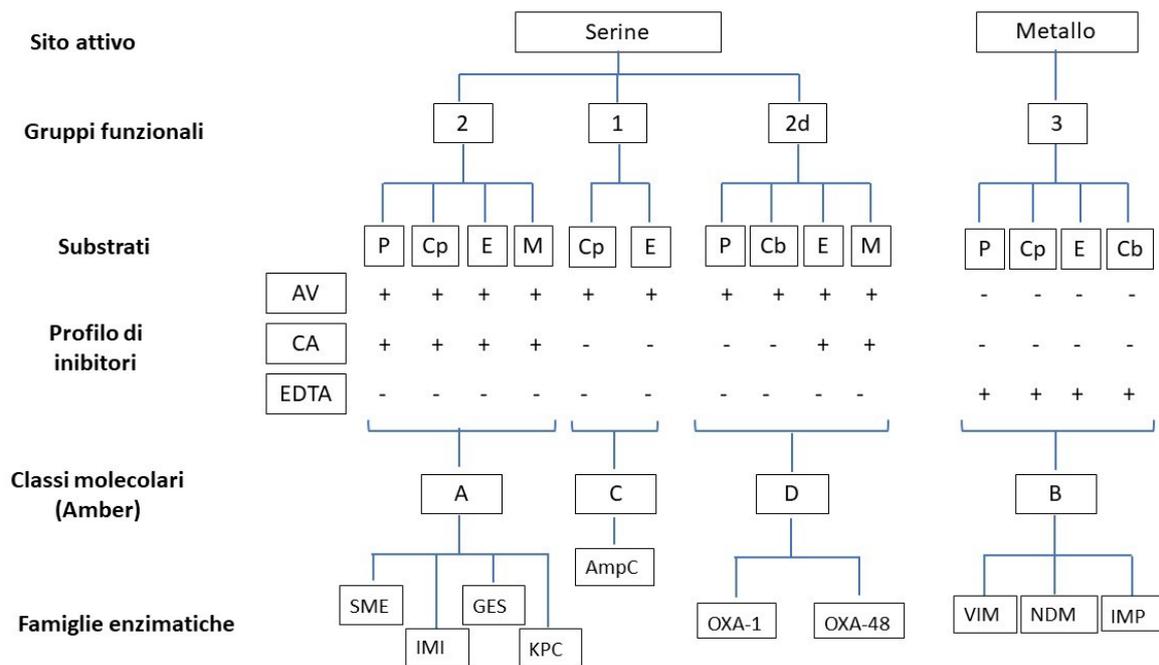
Successivamente è stata introdotta la classificazione molecolare di Amber, basata sulla sequenza amminoacidica primaria. In questo caso gli enzimi si dividono in 4 gruppi: A, C, D, accomunate da una serina a livello del sito

attivo, e B, che al contrario delle altre ha uno o più atomi di zinco nel sito attivo.

Ad oggi con questa classificazione si possono distinguere circa 17 gruppi funzionali combinando più sistemi biochimici e molecolari (*Bush, 2018*).

**Figura 5:** Classificazione  $\beta$ -lattamasi.

(Il simbolo “+” indica idrolisi/inibizione mentre il simbolo “-” l’assenza di idrolisi/inibizione. AV, avibactam; CA, acido clavulanico; EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; P, penicillina; Cp, cefalosporine; E, cefalosporine ad ampio spettro; M, monobattamici, Cb, carbapenemi).



### ***1.2.2.1. Carbapenemasi di classe A***

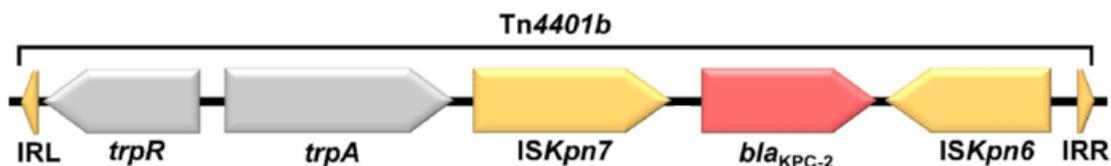
Le carbapenemasi di classe A sono caratterizzate dalla presenza di una serina nel sito attivo e sono suscettibili all'azione di alcuni inibitori delle  $\beta$ -lattamasi, sia non  $\beta$ -lattamici come avibactam che  $\beta$ -lattamici come l'acido clavulanico.

Appartengono a questa classe diversi enzimi, tra cui SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI (Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase), GES (Guiana extended spectrum), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase).

Alcuni di questi enzimi, come SME e IMI, sono codificati a livello cromosomico, presentano una distribuzione specie-specifica e sono meno soggetti a diffusione mediante meccanismi di trasferimento genetico orizzontale. Altri enzimi invece, come GES e KPC si trovano abitualmente all'interno di plasmidi e per questo la loro diffusione a livello globale è più veloce e coinvolge anche specie e generi differenti (*Bush, 2018*).

In particolare, KPC è la serino-carbapenemasi più diffusa tra le *Enterobacteriaceae*, infatti dal 2001, data in cui è stata isolata per la prima volta negli Stati Uniti in un campione di *K. pneumoniae*, l'incidenza di ceppi KPC-produttori è sempre in crescita e la sua diffusione si è affermata a livello globale. Questo fenomeno è stato possibile perché il gene *bla*<sub>KPC</sub> si localizza

all'interno del trasposone *Tn4401*, il quale con eventi di ricombinazione e di trasferimento genico può facilmente spostarsi tra microrganismi diversi.



**Figura 6:** Piattaforma genetica del trasposone 4401.

IR: inverted repeat; trp: transposase; IS: insertion sequence; *bla*<sub>KPC</sub>: carbapenemase encoding-gene

**Fonte:** Lee et al., 2016

Il primo allele del gene *bla*<sub>KPC</sub> isolato da un plasmide è stato indicato come *bla*<sub>KPC-1</sub>, ma subito dopo è stata identificata una variante denominata *bla*<sub>KPC-2</sub>, che differisce rispetto a *bla*<sub>KPC-1</sub> per un solo amminoacido e risulta essere la variante più diffusa globalmente nei Gram-negativi (Diene and Rolain, 2014). In Europa la più alta incidenza di KPC è stata rilevata in Grecia e in Italia, dove tra il 2014 e il 2015 è stata riscontrata una situazione endemica (Van Duin and Doi, 2016).

In generale gli isolati KPC-positivi hanno un profilo multi-resistente ma alcuni rimangono sensibili a gentamicina, colistina e tigeciclina.

Il contributo dei meccanismi di trasferimento genetico orizzontale alla diffusione di questo gene è testimoniato dall'identificazione negli ultimi anni

del plasmide *pCOL-1* di *P. aeruginosa* caratterizzato dal trasposone Tn4401 contenente il gene codificante KPC (Diene and Rolain, 2014).

#### **1.2.2.2. Carbapenemasi di classe B**

Le carbapenemasi di classe B sono definite metallo  $\beta$ -lattamasi, infatti sono caratterizzate da uno o più atomi di zinco a livello del sito attivo. Fanno parte di questo gruppo VIM , NDM e IMP , individuati nelle *Enterobacteriaceae* all'interno di plasmidi o elementi genetici mobili cromosomici.

A differenza delle serino carbapenemasi, queste vengono inibite dall'EDTA, (acido etilendiamminotetraacetico), un agente chelante.

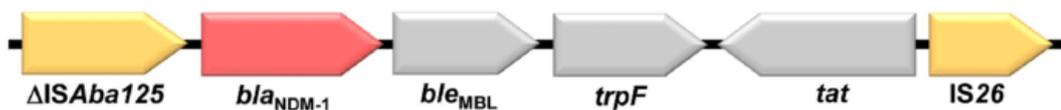
Inoltre, è stata riscontrata la loro presenza anche in *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Diene and Rolain, 2014).

IMP è stata descritta per la prima volta nel 1994 in un isolato di *Serratia marcescens* in Giappone, ma successivamente si è diffusa molto velocemente in altre aree del mondo e in altre specie: in particolare nel 2000 si è registrata la sua presenza in numerose specie di Gram negativi come *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*.

La carbapenemasi VIM è stata descritta per la prima volta nel 1997 a Verona in *P. aeruginosa* e ad oggi presenta 30 varianti diverse. Il gene *bla<sub>VIM</sub>* è localizzato all'interno di un integrone di classe I adiacente al gene *aacA4* responsabile della resistenza agli aminoglicosidi.

Le NDM sono le ultime metallo  $\beta$ -lattamasi scoperte; infatti, il primo ceppo produttore di NDM è stato isolato nel 2009 da un paziente svedese di origine indiana che era recentemente tornato da un viaggio a New Dehli (*Yong AAC, 2009*).

Il gene  $bla_{NDM}$  è altamente trasmissibile: diversi lavori hanno, infatti, identificato la presenza di questo marcatore di resistenza su trasposoni di differenti tipi associati a varie sequenze di inserzione. Solitamente NDM si trova sullo stesso elemento genetico che codifica il gene di resistenza alla bleomicina,  $ble_{MBL}$ , il quale si pensa abbia influito nella diffusione del gene  $bla_{NDM}$  nelle *Enterobacteriaceae* e in *A. baumannii* (*Diene and Rolain, 2014*).



**Figura 7:** Rappresentazione orizzontale del Tn125, contesto genetico comune nel quale è localizzato il gene  $bla_{NDM}$ .

**IS:** insertion sequence; **trp:** transposase;  $bla_{NDM}$ : carbapenemase encoding-gene;  $ble_{MBL}$ : bleomycin resistance protein.

**Fonte:** Lee et al, 2016

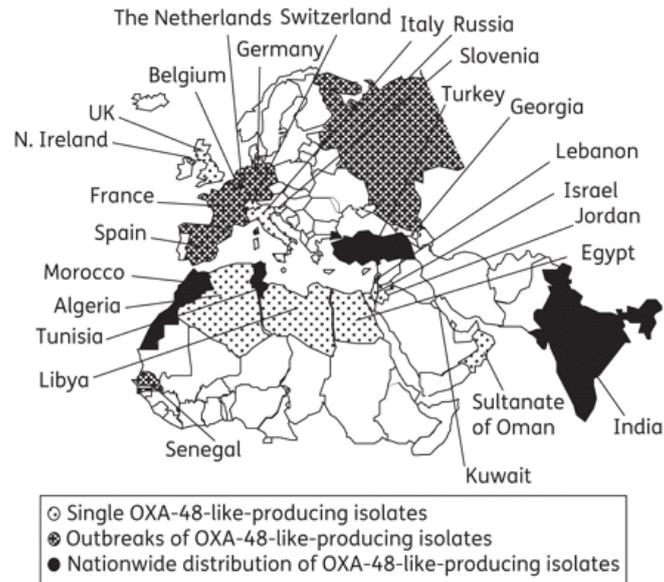
### **1.2.2.3. Carbapenemasi di classe D**

Le carbapenemasi di classe D sono in grado di idrolizzare le oxacilline e per questo sono denominate OXA  $\beta$ -lattamasi. Presentano una serina nel sito attivo e sono inibite dagli inibitori non  $\beta$ -lattamici come l'avibactam (la suscettibilità agli inibitori  $\beta$ -lattamici invece è variabile a seconda del tipo di *bla*<sub>OXA</sub>. (Bush,2018)

I geni più frequentemente riscontrati in *A. baumannii* sono *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> (che costituiscono delle  $\beta$ -lattamasi cromosomiche intrinseche) mentre in *K. pneumoniae* *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-162</sub> e *bla*<sub>OXA-181</sub>.

La prima OXA-48 è stata isolata in un campione di *K. pneumoniae* nel 2001 in Turchia e sembrerebbe che questo gene abbia origine da *Shewanella oneidensis*, un batterio ambientale che sintetizza il gene *bla*<sub>OXA-54</sub>, il quale ha il 92% di omologia con la sequenza amminoacidica di *bla*<sub>OXA-48</sub> (Steward et al.,2018).

Questa carbapenemasi si può trovare sia a livello cromosomico che a livello plasmidico. Per quello che riguarda la sua distribuzione globale, in Turchia tra il 2014 e il 2015 è stato registrato il più alto livello epidemiologico con il 92% di CPE produttori di OXA-48. Successivamente, isolati con il gene codificante OXA-48 sono stati identificati in altri paesi come Medio Oriente, Africa, Asia, sud America ed Europa (Van Duin and Doi, 2016).



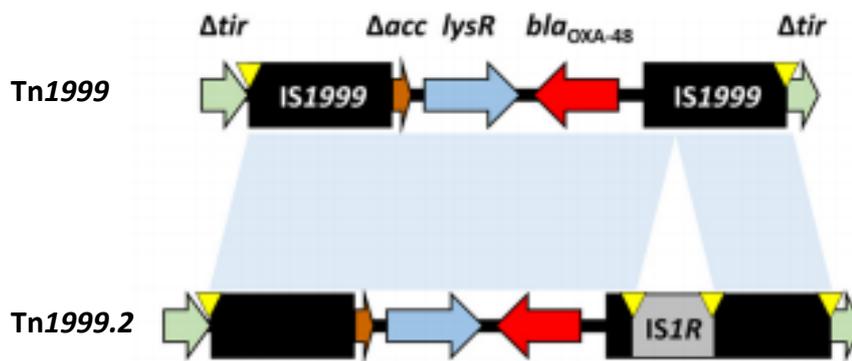
**Figura 8:** Distribuzione geografica degli isolati produttori del gene *bla*<sub>OXA-48</sub>.

**Fonte:** *Poirell et al., 2012*

*bla*<sub>OXA-48</sub> è localizzato sul trasposone *Tn1999*, affiancato da due copie, una a valle e una a monte, di elementi IS1999, i quali ne permettono la mobilizzazione.

In *K. pneumoniae* è stata identificata una variante del *Tn1999*, il *Tn1999.2*, che presenta l'inserzione di IS1R a monte del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> migliorando, così, la sua espressione. Infatti, gli isolati presentanti il *Tn1999.2* hanno dei valori di MIC (minima concentrazione inibente) ai carbapenemi più elevati rispetto a quelli che possiedono il *Tn1999* (*Poirel et al., 2012*).

La presenza del trasposone *1999* o *1999.2* influenza il fenotipo del ceppo ospite e le caratteristiche di mobilizzazione del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> (*Sattler et al, 2022*).



**Figura 9:** Piattaforma genetica dei trasposoni 1999 e 1999.2.

IS: insertion sequence; lysR: transcriptional regulator, LysR family

**Fonte:** Sattler et al., 2022

Inizialmente, era stato ipotizzato che il gene *bla*<sub>OXA-48</sub> fosse localizzato all'interno di un plasmide di circa 70kb, che non presentava altri determinanti di resistenza e rappresentava la piattaforma genetica responsabile della diffusione della carbapenemasi. Ulteriori analisi di sequenza hanno, invece, rilevato che il gene *bla*<sub>OXA-48</sub> era localizzato sul *Tn1999*, che era a sua volta inserito all'interno del plasmide (IncL-M plasmid). Questo plasmide funge da contenitore anche per altri geni di antibiotico resistenza e risulta essere ampiamente diffuso all'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. (Poirel et al., 2012).

Ad oggi OXA-48 è la carbapenemasi di classe D più diffusa ed è caratteristica di *K. pneumoniae* ST395, clone maggiormente diffuso e considerato ad alto rischio. Infatti, è responsabile di numerosi outbreak in ambito ospedaliero.

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare sia a livello fenotipico che genotipico 8 ceppi di *K. pneumoniae* risultati positivi al gene *bla<sub>OXA-48</sub>* provenienti da pazienti ricoverati presso gli “Ospedali Riuniti” di Ancona tra Dicembre 2021 e Giugno 2022. Non essendo mai state riscontrate prima *Kp* OXA-48 da campioni clinici nel nostro ospedale ed essendo state identificate in un così ristretto lasso di tempo sono state studiate al fine di determinarne l'appartenenza o meno allo stesso clone epidemiologico.

### **3. MATERIALI E METODI**

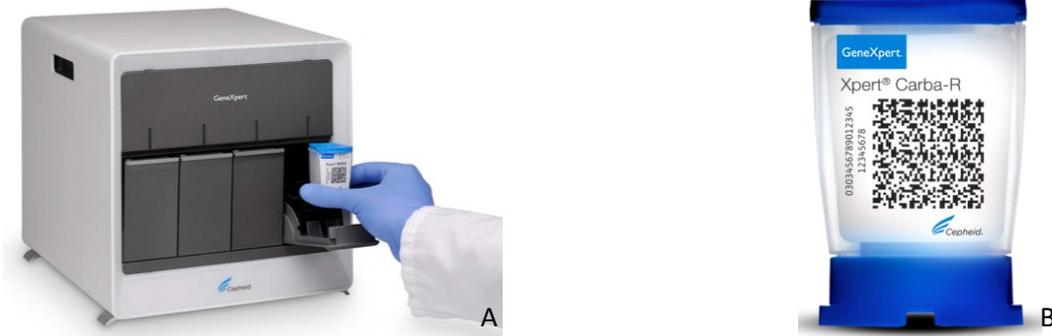
#### ***3.1 Ceppi batterici***

Da Dicembre 2021 ad oggi sono stati isolati 8 ceppi di *K. pneumoniae*-OXA-48 dal laboratorio di Microbiologia Clinica degli Ospedali Riuniti di Ancona. 6 degli 8 ceppi sono stati isolati da tampone rettale mentre gli altri due rispettivamente da emocoltura e urine. [Tabella 4].

I pazienti erano ricoverati in reparti diversi (Gastroenterologia, Nefrologia, Medicina generale sub-intensiva, Medicina generale, Rianimazione e Clinica ematologica).

#### ***3.2 Genexpert***

Il laboratorio di Microbiologia ha verificato la presenza, nei ceppi, del gene codificante per la OXA-48 mediante lo strumento GeneXpert (Cepheid), utilizzando il kit Xpert Carba-R. Viene effettuata una reazione di PCR real-time che rileva le carbapenemasi più diffuse in ambiente ospedaliero (KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP).



**Figura 10:** A: GeneXpert

B: test Xpert Carba-R.

Si inserisce nello strumento (A) per la rilevazione delle carbapenemasi

### ***3.3 Saggi di amplificazione***

La presenza del gene codificante per la OXA-48 è stata verificata attraverso i saggi di amplificazione di PCR (*Polymerase Chain reaction*), utilizzando i primer OXA48-F (TTGGTGGCATCGATTATCGG) e OXA48-R (GAGCACTTCTTTTGTGATGGC).

Sono stati eseguiti 30 cicli di amplificazione, durante i quali si ripetono 3 fasi: la fase di denaturazione condotta a 94°C, quella di annealing a 59°C (in base alla temperatura di melting dei primer, ossia la temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA sono denaturate) e infine la fase di allungamento a 72°C per 45 secondi.

La Taq polimerasi riesce ad amplificare circa 1000 bp al minuto. Il nostro amplificato è lungo circa 743 bp per cui 45 secondi sono sufficienti affinché venga processato l'intero gene.

Per ottenere i prodotti di amplificazione è stata usata la DreamTaq polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) e la coppia di primer riportata nella tabella 2.

Al termine della PCR, gli amplificati sono stati risolti mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% contenente 1x Green gel (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia) attraverso una camera elettroforetica con buffer di corsa TAE 1x (Tris Acetato EDTA) e applicando una corrente di 90 volt.

Come peso molecolare standard è stato usato il GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

**Tabella 2:** Primer utilizzati per lo studio

Gene	Designazione	Sequenza (5'-3')	TM	Lunghezza	Dimensione amplicone	Referenza
bla-OXA-48-like	OXA-48 F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	57	20 basi	743 bp	Galani et al. 2018
	OXA-48 R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC		21 basi		

### **3.4 Tipizzazione**

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

### **3.4.1 PFGE**

La tecnica di PFGE è il “gold standard” per stabilire se due o più ceppi sono epidemiologicamente correlati o meno.

Permette la separazione del DNA genomico in pochi frammenti ma con un peso molecolare elevato dopo la digestione con un determinato enzima, il quale taglia infrequentemente il DNA. Per separare i frammenti si effettua un'elettroforesi in campo pulsato, vale a dire che l'orientamento del campo elettrico viene periodicamente cambiato.

Il protocollo prevede la crescita overnight dei ceppi di *K. pneumoniae* su piastre di MacConkey, per poi stemperarli in 2 ml di *Suspension buffer* (SB) e diluirli fino ad ottenere una densità ottica (O.D.) compresa tra 0,6 e 0,8 a 610 nm.

A questo punto 350 µl delle brodoculture vengono aliquotate nelle eppendorf per poi aggiungere ugual volume di *Low Melt Agarose* all'1,6%.

Una volta preparata questa miscela si procede con la preparazione delle plugs versandone circa 100 µl all'interno di appositi stampi (plug mold). Si lasciano asciugare a temperatura ambiente e successivamente si mettono in frigo a 4°C per qualche minuto per completare la solidificazione.

Successivamente si procede con l'incubazione delle plugs in 5 ml di *Lysis buffer* e proteinasi K (20 mg/ml) a 56°C per un overnight.

Terminata l'incubazione si effettuano 5 lavaggi delle plugs: 2 con 5 ml di acqua tiepida e 3 con 5 ml di *TE Buffer* tiepido per rimuovere completamente la proteinasi K presente, che potrebbe interferire con gli step successivi.

Metà plug è stata, poi, incubata overnight con l'enzima XbaI a una concentrazione di 30 U (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) per permettere la digestione del DNA, la quale è stata bloccata con 500 µl di EDTA 0,5 M.

Si montano le plugs sul pettine per poterle includere all'interno di un gel di Pulsed Field Certificate Agarose (Bio-Rad) all'1% e si procede con la corsa elettroforetica in *TBE* (Tris Borato EDTA) *Buffer* mediante l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Bio-Rad).

Si impostano i seguenti parametri per l'enzima XbaI: tempo 20 ore, campo 6 V/cm, angolo 120°, switch iniziale 2.2 secondi, switch finale 54.2 secondi e ramping factor lineare.

Al termine della corsa il gel viene colorato con bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml e visualizzato al transilluminatore.



**Figura 11:** Chef Mapper XA System

I profili di PGFE dei ceppi vengono confrontati tra di loro per stabilire eventuali correlazioni epidemiologiche: i profili che differiscono per una o due bande si considerano dello stesso clone epidemico, mentre se ci sono tre o più bande diverse i pulsotipi sono correlati. Infine, se le bande diverse sono più di quattro sicuramente non c'è correlazione tra ceppi (*Tenover FC et al., 1995*).

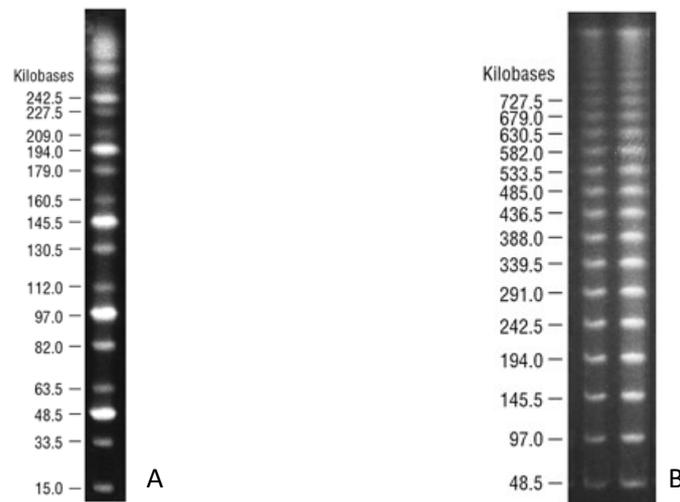
Per stabilire il numero e le dimensioni dei plasmidi presenti all'interno di ogni ceppo è stata effettuata una S1-PFGE. Il procedimento è il medesimo della XBaI-PFGE ma con alcune modifiche: la prima riguarda la digestione da parte dell'enzima; infatti, si incuba metà plug con la S1-nuclease (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) ad una concentrazione di 100 U per 30 minuti e la digestione si blocca con 500 µl di EDTA 0,5 M.

L'enzima permette il taglio dei soli plasmidi a livello delle ORI (origine di replicazione) e la mancata digestione del cromosoma, inoltre il taglio fa sì che

avvenga la loro linearizzazione e quindi la corrispondenza del peso molecolare con la migrazione sul gel.

La seconda modifica consiste nell'utilizzare i marker per visualizzare le dimensioni dei plasmidi, in particolare sono stati usati il MidRange PFG Marker (New England BioLabs) [Figura 12A], con il seguente range di dimensioni 15 kb-291 kb, e il Lambda PFG Ladder (New England BioLabs) [Figura 12B], 48,5 kb-1,018 kb.

La terza modifica riguarda l'impostazione della macchina, infatti per separare i plasmidi il tempo di corsa è di 18 ore, l'angolo di 120°, il campo di 6 V/cm, lo switch iniziale di 0.5 secondi, lo switch finale di 20 secondi e il ramping factor lineare.



**Figura 12:** A: MidRange PFG marker  
B: Lambda PFG Ladder

### **3.4.2 MLST**

MLST (*Multi-locus Sequence Typing*) è una tecnica che permette di assegnare un sequence type (ST) ai vari isolati batterici sulla base allelica di 7 geni housekeeping. È stato possibile ricavare gli ST mediante l'utilizzo dei dati di WGS (Whole Genome Sequencing) tramite il sito <https://www.genomicepidemiology.org/>.

### **3.5 Antibiotici**

Gli antibiotici utilizzati per i test di sensibilità sono Amikacina, Colistina, Levofloxacin, Ciprofloxacin, Tigeciclina, Aztreonam, Meropenem, Ceftazidime e Ceftazidime-avibactam, Ertapenem, Imipenem, Cefiderocol e Trimetoprim-sulfametoxazolo acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Co, Milano) sotto forma di polvere. In seguito, sono stati risospesi con l'utilizzo dello specifico solvente in un adeguato volume per ottenere un'aliquota con una concentrazione di 10000 mg/L e conservati a -20°C.

### **3.6 Test di sensibilità**

I test di sensibilità per stabilire i valori di MIC, ossia la minima concentrazione inibente, per tutti gli antibiotici sono stati eseguiti mediante il metodo della microdiluzione in brodo seguendo le linee guida riportate dall'EUCAST (<https://www.eucast.org/>).

È stato usato come ceppo di controllo *Escherichia coli* ATCC 25922, ad eccezione del Cefiderocol dove è stato usato il ceppo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e i valori di MIC sono stati interpretati secondo le tabelle dei breakpoint dell'EUCAST (EUCAST 2022) e riportati in tabella 3 (<https://www.eucast.org/>).

Gli inoculi per la microdiluizione in brodo sono stati standardizzati con il terreno Mueller Hinton II (MHII) ad una concentrazione di  $1 \times 10^8$  UFC/ml, tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro: l'assorbanza viene misurata con una lunghezza d'onda di 625 nm tenendo in considerazione che una O.D.<sub>625nm</sub> di 0,1 corrisponde a  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml.

Le brodoculture standardizzate, prima di essere inoculate all'interno della microtiter preparata con diluizioni scalari di antibiotico, sono state diluite 1:100 per ottenere una concentrazione di  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

**Tabella 3:** Breakpoints degli antibiotici utilizzati per la determinazione della MIC

Antibiotico	Breakpoints Enterobacterales mg/L	
	Sensibile	Resistente
Amikacina	$\leq 8$	$> 8$
Colistina	$\leq 2$	$> 2$
Levofloxacin	$\leq 0.5$	$> 1$
Ciprofloxacina	$\leq 0.25$	$> 0.5$
TMP-SXT* <sup>1</sup>	$\leq 2$	$> 4$
Tigeciclina	$\leq 0.5$	$> 0.5$
Aztreonam	$\leq 1$	$> 4$
Meropenem	$\leq 2$	$> 8$
Ceftazidime	$\leq 1$	$> 4$
CZA* <sup>2</sup>	$\leq 8$	$> 8$
Ertapenem	$\leq 0.5$	$> 0.5$
Imipenem	$\leq 2$	$> 4$
Cefiderocol	$\leq 2$	$> 2$

\*<sup>1</sup> TMP-SXT (Trimetoprim-Sulfametoxazolo): la concentrazione è di 1:19 e i breakpoints considerati sono del Trimetoprim.

\*<sup>2</sup> CZA (Ceftazidime-avibactam): per la determinazione della MIC, la concentrazione dell'Avibactam è fissata a 4 mg/L.

### ***3.7 Estrazione DNA totale***

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

Il protocollo prevede di lasciar crescere per un'overnight a 37°C i ceppi batterici su piastra nel loro adeguato terreno di coltura per poi risospendere in 5 ml di soluzione fisiologica una quantità tale da rendere la brodocoltura torbida. Quindi si preleva 1,5 ml, si sposta in una eppendorf e si centrifuga per 2 minuti a 12000 g (rcf).

Il sovrantante viene eliminato, si risospende il pellet in 180 µl di *Lysis Solution T* e per eliminare le molecole di RNA presenti si aggiungono 20 µl di *RNasi A Solution*, si mescola e si lascia incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione si aliquotano 20 µl di *Proteinasi K* (20 mg/ml) per permettere la rottura della membrana cellulare e la digestione delle proteine presenti, quindi si incuba a 55°C per 30 minuti.

Successivamente vengono aggiunti 200 µl di *Lysis Solution C* mescolando bene fino ad ottenere un composto omogeneo perché solo in questo modo è possibile una lisi efficiente, si incuba di nuovo a 55°C per 10 minuti.

Trascorso il tempo d'incubazione, al lisato si aggiungono 200 µl di etanolo al 95% mescolando bene per favorire la precipitazione del DNA, si trasferisce

tutto sulla colonnina precedentemente preparata con 500 µl di *Column Preparation Solution*, che massimizza l'adesione del DNA alla membrana della colonnina, centrifugata per 1 minuto a 12000 g. Il lisato trasferito nella colonnina viene centrifugato per 1 minuto a 6500 g quindi l'eluato viene eliminato perché il DNA si è legato alla colonnina.

Si eseguono 2 lavaggi con 500 µl rispettivamente di *Wash Solution 1* per 1 minuto a 6500 g e *Wash Solution concentrate* con etanolo per 3 minuti a 6500 g.

Dopo i lavaggi si trasferisce la colonnina in una nuova eppendorf e si esegue la fase di eluizione del DNA con 200 µl di *Elution Solution* per 1 minuto a 6500 g e per aumentare la resa si ripete questo step due volte.

Il DNA appena estratto e contenuto nella eppendorf si conserva in frigo a 4°C per alcuni giorni, mentre a -20°C per lunghi periodi.

Nel caso in cui il DNA venga utilizzato per esperimenti di sequenziamento, dopo l'estrazione è necessario verificare la qualità mediante una corsa elettroforetica e la quantità del DNA con un fluorimetro.

### **3.7.1 Elettroforesi**

Il DNA estratto deve essere, successivamente, sottoposto a sequenziamento quindi è necessario che non sia troppo frammentato per ottenere un buon risultato.

Si analizzano i campioni con una corsa elettroforetica su gel d'Agarosio all'1% con 1x Green Gel (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia) e i campioni vengono uniti con il Loading Dye per aumentare il peso e consentire l'ingresso del DNA nel gel d'agarosio (in caso contrario il DNA migrerebbe attraverso il tampone direttamente al polo positivo). Il voltaggio applicato è di 90 volt.

Al termine della corsa se l'impronta lasciata dal DNA consiste in bande ben precise ed intense, allora il DNA non è frammentato.

Ma se al contrario è presente uno smear, ossia una striscia lunga e diffusa, il DNA è frammentato quindi non ottimale per un esperimento di WGS.

### **3.7.2 Qubit 4**

Il Qubit 4 è un fluorimetro che permette di misurare in maniera veloce e precisa la quantità di DNA, RNA e proteine, per cui dopo l'estrazione si procede con la misurazione della quantità dell'acido nucleico in funzione del sequenziamento.

Il protocollo prevede per prima cosa di costruire la retta di calibrazione mediante la misurazione di due miscele con i due standard, i quali indicano il valore più basso e quello più alto che riesce a misurare lo strumento. Le due miscele sono composte dall'unione di 190 µl di *Working Solution* (buffer + fluorofori) e 10 µl rispettivamente dello *standard 1* e dello *standard 2*.

Si vortexa e si lascia incubare per 2 minuti, così da permettere alla soluzione di raggiungere la massima fluorescenza. Quindi si procede alla misurazione.

Una volta costruita la retta di calibrazione, lo strumento è pronto per quantizzare il DNA. Si prepara la miscela con 198  $\mu\text{l}$  di *Working Solution* e 2  $\mu\text{l}$  di DNA estratto, per un volume totale di 200  $\mu\text{l}$ . Si vortexa e si incuba per 2 minuti a temperatura ambiente. Si inserisce nello strumento, al quale è necessario indicare quanto campione è stato aliquotato, quindi viene eseguita la lettura e la quantità viene espressa in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .



**Figura 13:** Qubit 4 fluorometer

### ***3.8 Sequenziamento ed analisi di sequenza***

Il sequenziamento dell'intero genoma dei ceppi è stato eseguito mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) usando gli strumenti *Oxford Nanopore MinION Mk1B* e *Illumina Miseq* con reads 2x250 bp.

#### ***3.8.1 Oxford Nanopore MinION***

Questa tecnologia oltre all'estrazione del DNA dei ceppi e alla preparazione della libreria, necessari anche per altri sistemi NGS, richiede una limitata frammentazione del genoma.

Il MinION è uno strumento di piccole dimensioni, poco ingombrante (105mm x 23mm x 33mm) e può essere facilmente controllato dal software MinKNOW™, infatti grazie ad una porta USB può essere collegato al computer. Riesce a generare reads anche molto lunghe nell'ordine delle Megabasi (Mb).

Il sequenziamento si basa sulla tecnica del “sequenziamento a nanopori”, quindi si usano dei nanopori inseriti in una membrana, che formano dei canali attraverso i quali passa la soluzione contenente le molecole di DNA da sequenziare. I filamenti di DNA vengono letti in un unico senso, 5' → 3', generando reads single end.

La membrana si trova all'interno di una flow cell, alla quale viene applicato un voltaggio e ogni volta che passa un nucleotide all'interno di un nanoporo si registra una variazione specifica di voltaggio.

Ciascun segnale elettrico viene convertito nella corrispondente base azotata mediante il processo di basecalling, effettuato al termine del sequenziamento.

Il basecalling genera delle reads in formato FASTQ, mentre le tracce elettriche vengono salvate in formato fast5 (proprietario di Nanopore).



**Figura 14: A: MinION  
B: Flow cell**

### ***3.8.1.1 Flow cell***

Le flow cell sono il supporto base del sequenziamento che contiene i nanopori.

Ogni flow cell contiene 512 pori e 2048 elettrodi disposti in maniera esagonale sulla superficie dell'array, i quali permettono di sequenziare fino a 96 campioni contemporaneamente, riconoscibili mediante il processo di

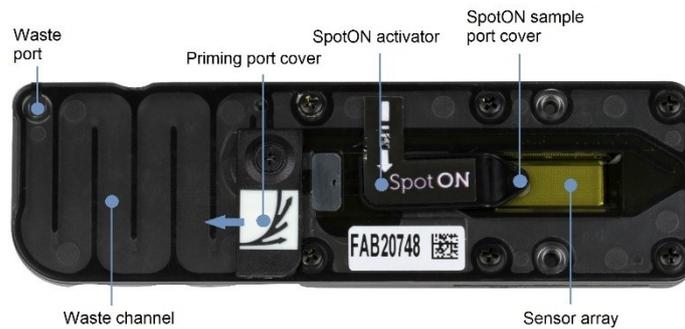
barcoding, che viene effettuato al momento della preparazione della libreria.

Il barcoding consiste nel legare a ciascuna sequenza di DNA un barcode nucleotidico (etichetta) che ne permette l'identificazione sia durante che al termine del sequenziamento.

La flow cell è costituita da diverse componenti:

- Priming port → dove si inserisce il buffer di sequenziamento e la *Wash solution* per lavare la flow cell al termine di una corsa
- SpotON port → si trova nei pressi del sensore ad array, infatti è dove viene caricata la libreria
- Sensore ad array
- Un canale (capacità 2 ml) e due porte di scarico → per eliminare i prodotti di scarto

Una flow cell integra può essere conservata a 4°C per circa 12 mesi mentre a temperatura ambiente per 30 giorni. Vengono consegnate con lo storage buffer all'interno dei canali, per mantenere l'equilibrio osmotico della cella, infatti la soluzione è costituita da sali e una coppia redox che permette alla corrente elettrica di fluire all'interno. Quindi prima di iniziare una corsa è importante rimuovere il buffer mediante l'utilizzo di una pipetta attraverso la priming port e sostituirlo con il *Flush Buffer* (FB).



**Figura 15:** Struttura di una flow cell

### 3.8.1.2 *Rapid Barcoding Sequencing kit*

Il *Rapid Barcoding Sequencing kit* (SQK-RBK004) è il kit che permette di sequenziare contemporaneamente 12 campioni, in questo caso ha permesso di analizzare tutti e 8 i ceppi dello studio nello stesso momento, dopo aver estratto e verificato la quantità e la qualità del DNA.

Il kit contiene:

- RAP (*Rapid Adapter*): adattatori legati a proteine motrici
- SQB (*Sequencing Buffer*)
- LB (*Loading Beads*)
- RB01-RB12 (*Fragmentation Mix RB01-RB12*)

Per poter preparare la libreria è necessario anche il *Flow Cell Priming kit* (EXP-FLP002) che contiene il *Flush Buffer* (FB) e il *Flush Tether* (FLT).

La preparazione delle 12 librerie di DNA prevede come prima cosa lo scongelamento dei reagenti, in particolare RAP e RB01-RB12 devono essere

tenuti in ghiaccio fino al momento del loro utilizzo, mentre SQB, LB, FB e FLT a temperatura ambiente.

Si preparano 12 vials da PCR, dove in ognuna verranno messi fino a 7,5 µl di DNA (sono richiesti almeno 400 ng di DNA per campione. Nel caso di concentrazioni maggiori è possibile diluire il campione con acqua ultrapura), e 2,5 µl di RB specifico.

Le 12 miscele dopo averle mescolate bene vengono inserite nel termociclatore per il processo di frammentazione e barcoding (1 minuto a 30°C e 1 minuto a 80°C) e, al termine vengono messe in ghiaccio per abbassare la temperatura.

I 12 campioni saranno “etichettati” con un barcode differente che ne permetterà il riconoscimento alla fine del processo di sequenziamento.

A questo punto le 12 miscele vengono prelevate e unite per formare un unico pool su un'eppendorf da 1,5 ml.

Per purificare il pool di librerie appena creato si aggiunge ugual volume di AMPure XP beads, una soluzione di biglie magnetiche da risospendere con il vortex prima dell'utilizzo. Le biglie sono cariche positivamente, quindi legano il DNA che ha una carica totale negativa e le sostanze indesiderate possono essere rimosse. Per la rimozione, l'eppendorf con le biglie e il DNA viene posizionata su un magnete, così le biglie si concentrano e il sovrnatante può essere rimosso. Lasciando l'eppendorf nel magnete si

procede con il lavaggio del pellet aggiungendo e rimuovendo 200  $\mu$ l di etanolo al 70% per due volte. Si elimina per bene tutto l'etanolo e si lascia asciugare il pellet.

Una volta asciutto, si rimuove l'eppendorf dal magnete, si risospende il pellet con 12  $\mu$ l di 10mM Tris-HCl pH 7.5-8.0 + 50mM NaCl e si lascia incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.

L'utilizzo del Tris-HCl permette l'eluizione del DNA dalle biglie e la sua risospensione nel sovrantante. Si riposiziona l'eppendorf nel magnete per rimuovere le biglie e si prelevano 10  $\mu$ l di eluato che serviranno per la creazione della libreria.

Infatti, si aggiungono ai 10  $\mu$ l di eluato, gli adattatori di sequenziamento, vale a dire 1  $\mu$ l di RAP e si lascia incubare 5 minuti a temperatura ambiente.

La libreria è pronta quindi si lascia in ghiaccio fino al caricamento nella flow cell.



**Figura 16:** Magnetic rack. Le biglie, dove è legato il DNA, vengono attratte dal magnete quindi si posiziona su un lato della eppendorf permettendo, così, la rimozione del sovrantante.

La flow cell viene inserita nel MinION e per prima cosa si effettua il check dei pori mediante il software MinKNOW™ per individuare il numero di pori disponibili per il sequenziamento. Dopo di che si procede con il priming della cella di sequenziamento: per prima cosa si rimuovono 20-30 µl di *Storage buffer* con una p1000 tramite la priming port facendo attenzione a non far entrare bolle d'aria nel canale. Questa procedura permette di avere continuità di liquido all'interno della camera ed evita l'inserimento di bolle nella flow cell che ne comprometterebbe la funzionalità.

Si prepara la priming mix mescolando 30 µl di FLT direttamente nel tubo di FB, quindi si prelevano 800 µl, si inseriscono nella priming port e si lascia incubare per 5 minuti durante i quali si finisce la preparazione della libreria.

In una nuova eppendorf si mescolano 34 µl di SQB, 11 µl di libreria precedentemente preparata, 4,5 µl di acqua ultrapura e 25,5 µl di LB, da vortexare appena prima dell'utilizzo per evitare che le biglie si depositino sul fondo.

A questo punto si apre la SpotON port e si inseriscono altri 200 µl della priming mix nella priming port e infine si inoculano 75 µl della libreria goccia a goccia nella SpotON port.

Una volta chiuse entrambe le porte è possibile far partire la corsa mediante il software MinKNOW.

Il protocollo completo per un'adeguata preparazione della flow cell e della libreria dei campioni è consultabile sul sito Oxford Nanopore Technologies (<https://nanoporetech.com/>).

### **3.8.2. Illumina Miseq**

Lo strumento Illumina Miseq è costituito da:

- ✦ uno scomparto della cella a flusso → dove è posizionata la flow cell
- ✦ uno scomparto per i reagenti → dove sono posizionati i reagenti mantenuti alla giusta temperatura e la cartuccia per il sequenziamento.

La cartuccia è formata da tanti piccoli serbatoi sigillati, che contengono tutti i reagenti necessari per la costruzione dei cluster e per il sequenziamento. Nel serbatoio etichettato “Load Sample” viene caricata la libreria.

- ✦ un monitor touch screen → per poter controllare il sequenziamento



**Figura 17:** Illumina MiSeq

L'Illumina Miseq è una tecnologia di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing by synthesis SBS), infatti si basa su tre step: generazione di cluster, sequenziamento e analisi dei dati.

La generazione dei cluster è un processo mediante il quale ogni frammento di DNA viene clonato in migliaia di copie identiche. La densità di cluster determina la qualità e la resa dei dati, per cui è importante quantizzare la libreria prima del sequenziamento.

Questo processo avviene nella flow cell, che è composta da un vetrino dotato di canali con una "distesa" di 2 diversi oligonucleotidi, per cui l'ibridazione si genera a partire da uno dei 2 frammenti oligonucleotidici che è complementare all'adattatore legato al frammento di DNA.

Viene sintetizzato il secondo filamento mentre quello originario viene eliminato. A questo punto avviene l'amplificazione a ponte, ossia il filamento formato si piega e l'adattatore libero prende contatti con il secondo oligonucleotide e la polimerasi genera il filamento complementare a ponte.

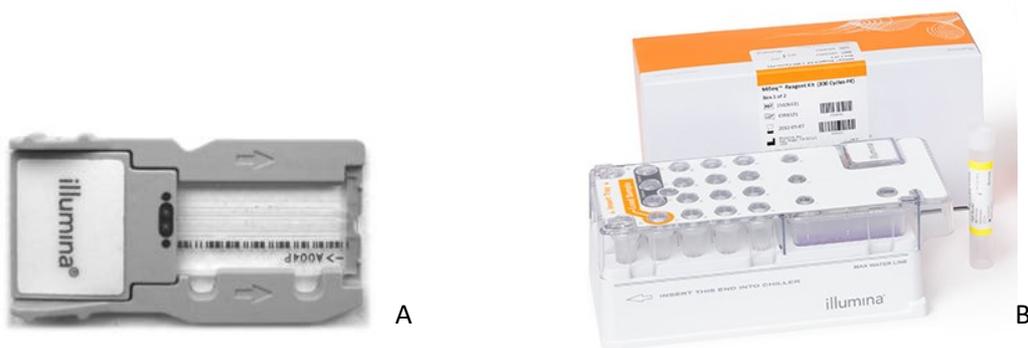
Il doppio filamento viene denaturato, così si formano due singoli filamenti legati alla flow cell. Questo processo si ripete milioni di volte formando cluster.

Successivamente avviene il sequenziamento di ogni filamento, vengono aggiunti uno alla volta i deossinucleotidi corrispondenti alla sequenza del

filamento e ognuno genera una fluorescenza univoca che lo rende riconoscibile.

I segnali vengono tradotti in basi a formare reads. Come risultato finale vengono generate due reads, una forward e una reverse (paired end) perché questa tecnologia di sequenziamento legge i frammenti sia in 3' → 5' che in 5' → 3'.

Il sequenziamento paired end genera delle reads con una qualità molto elevata.



**Figura 18:** A: Flow cell

B: Cartuccia contenente i reagenti per il sequenziamento con serbatoi riservati

### ***3.8.2.1 Illumina DNA Prep***

L'Illumina DNA Prep protocol è il kit più versatile di Illumina e permette di sequenziare anche genomi ad alto peso molecolare, richiedendo una quantità di DNA che va da 100 a 500 ng.

Per prima cosa è necessario quantizzare e standardizzare il DNA, per cui all'interno di una vials da PCR si inoculano 30 µl di DNA, opportunamente diluiti con acqua ultrapura per ottenere una quantità di 250 ng.

A questo punto si può procedere con la prima fase, la tagmentazione del DNA, che consiste nel preparare una Tagmentation Master Mix unendo BLT (*Bead-linked Transposomes*) e TB1 (*Tagment Buffer 1*). Si uniscono 11 µl di BLT con 11 µl di TB1 per ogni campione e si dispensano 20 µl della miscela in ogni vials mescolando bene.

A questo punto le vials con DNA e Tagmentation Master mix sono pronte per essere inserite nel termociclature ed essere processate per 15 minuti a 55°C.

Terminato il programma di PCR, si passa alla seconda fase, la post-tagmentation, vale a dire bloccare la tagmentazione.

Si aggiungono 10 µl di TSB (*Tagment Stop Buffer*) in ogni campione mescolando accuratamente e si trasferiscono le vials nuovamente nel termociclature per 10 minuti a 37°C. Al termine si spostano su un magnete per far depositare le biglie ed eliminare il sovrantante contenente i prodotti di

scarto. Quindi si procede con tre lavaggi del pellet aggiungendo e rimuovendo 100  $\mu$ l di TWB (*Tagment Wash Buffer*).

Si arriva, così, all'Amplify Tagmented DNA, la fase in cui si amplifica il DNA tagmentato e si aggiungono gli adattatori.

Si prepara la PCR Master mix mescolando 22  $\mu$ l di EPM (*Enhanced PCR mix*) e 22  $\mu$ l di acqua ultrapura, si dispensano 40  $\mu$ l di mix in ogni campione dopo aver eliminato il sovrnatante e aver rimosso l'eppendorf dal magnete. È importante risospendere bene il pellet.

A questo punto si aggiungono gli adattatori, 5  $\mu$ l di index i7 e 5  $\mu$ l di index i5 e si mescola bene tutta la mix. Gli adattatori sono costituiti da una sequenza specifica di 8 bp che permette di identificare il DNA e il campione corrispondente. Ad ogni campione viene assegnata una coppia unica di adattatori i7-i5.

La mix è pronta per essere messa nel termociclatore per il BLT PCR program, vale a dire 68°C per 3 minuti, 98°C per 3 minuti, 5 cicli di 98°C per 45 secondi, 62°C per 30 secondi e 68°C per 2 minuti, infine al termine dei cicli 68°C per 1 minuto.

Dopo l'amplificazione la libreria è pronta per essere purificata: si trasferiscono le vials sul magnete e si prelevano 40  $\mu$ l di sovrnatante da trasferire in provette nuove. Si aggiungono 45  $\mu$ l di IPB (*Illumina Purification*

*Beads*) e 40  $\mu$ l di acqua ultrapura, si mescola bene e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti.

Le provette vengono disposte sul magnete, si prelevano 125  $\mu$ l di sovrnatante da spostare in nuove vials dove sono già stati inoculati 15  $\mu$ l di IPB.

Trascorsi 5 minuti di incubazione si trasferiscono le librerie sul magnete e si rimuove il sovrnatante, a questo punto si procede con i lavaggi aggiungendo e rimuovendo 200  $\mu$ l di etanolo all'80% per due volte. Quindi si lascia asciugare il pellet.

Successivamente si aggiungono 32  $\mu$ l di RSB (*Resuspension Buffer*) per risospendere il pellet, quindi posizionando le provette sul magnete si prelevano 30  $\mu$ l di sovrnatante da spostare in vials nuove.

Per ottenere una densità di cluster adeguata è opportuno valutare la qualità di ogni libreria prima di fare il pool unico attraverso lo strumento TapeStation 4150 (Agilent), che mediante un'elettroforesi capillare permette di capire la qualità e la dimensione delle librerie. Per la TapeStation bisogna preparare le mix con 2  $\mu$ l di Sample Buffer e 2  $\mu$ l di libreria, si vortexa per 1 minuto e a questo punto si possono posizionare le vials nello strumento. Si imposta la macchina attraverso il software TapeStation Controller.

Oltre alla qualità viene anche valutata la concentrazione di ogni libreria attraverso il Qubit. Una volta ottenuti i risultati di dimensione e

concentrazione delle librerie si procede al calcolo della molarità della libreria attraverso la seguente formula:

$$\frac{\text{Concentrazione libreria} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{\text{Dimensioni libreria bp} \times 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \times 1000000 .$$

Le librerie vengono quindi standardizzate ad una molarità identica, si prelevano 5  $\mu\text{l}$  di ogni libreria e si uniscono in un'unica provetta per avere un pool totale. Come controllo di sicurezza, si procede ad un'ulteriore valutazione di qualità e quantità del pool mediante Qubit e TapeStation.

Si diluisce quindi il pool ad una concentrazione di 2 nM con il *Resuspension Buffer* su un volume finale di 100  $\mu\text{l}$ . A questo punto la libreria viene denaturata tramite ugual volume di una soluzione di NaOH 0,2 M. Dopo 5 minuti la reazione di denaturazione viene stoppata tramite aggiunta di Tris-HCl 10mM e la libreria ulteriormente diluita fino alla concentrazione di caricamento di 12 pM.

La libreria così preparata viene successivamente inoculata nella cartuccia, la quale poi verrà inserita nello scomparto dei reagenti dello strumento.

Nel frattempo, è stata inserita la flow cell nel suo scomparto, dopo averla lavata da eventuali sali e asciugata molto bene per evitare che i liquidi in eccesso influenzino il funzionamento.

### 3.8.3 Analisi di sequenza

Una volta ottenute le reads sia del sequenziamento Nanopore che Illumina viene controllata la loro qualità con il software *fastQC* (<https://github.com/s-andrews/FastQC>).

Le reads del sequenziamento Nanopore vengono debarcodate, vale a dire viene eliminata la sequenza del barcode, prima di essere assemblate, attraverso l'utilizzo del comando "*qcat*" nella macchina virtuale di Linux. A questo punto le reads si possono assemblare con il software *Canu v 1.9* (<https://github.com/marbl/canu>).

Al contrario le reads di Illumina si assemblano mediante il software *Spades v 3.13.1* (<https://github.com/ablab/spades>).

Mentre per eseguire un assemblaggio ibrido utilizzando sia le long reads del Nanopore che le short reads di Illumina si usa il software *Unicycler v 0.4.8* (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Queste reads sono state utilizzate per la ricostruzione dei plasmidi e del trasposone. I plasmidi sono stati costruiti utilizzando il software *Brig v 0.95*, mentre i trasposoni con il software *SnapGene v 6.0.4*.

Una volta assemblate le reads si procede all'analisi del genoma tramite *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e il sito *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>),

sfruttando i software *ResFinder*, *PlasmidFinder*, *MLST*, *VirulenceFinder* e *CSIPhylogeny*, necessario per la costruzione dell'albero filogenetico. I parametri utilizzati sono:

- la minima distanza tra SNPs → 10 bp
- la minima qualità degli SNP → 30
- il minimo dello Z-score (il numero di deviazioni standard rispetto alla media di un punto osservato) → 1,96

## 4. RISULTATI

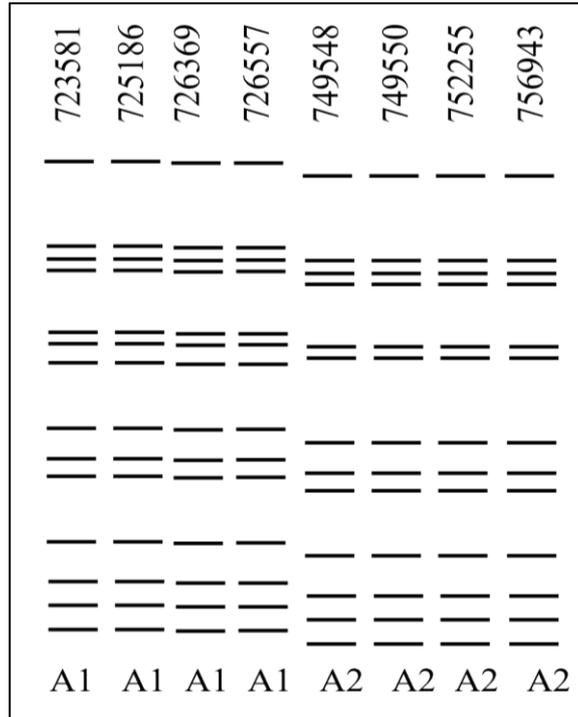
### 4.1 Saggi di amplificazione

Tutti i ceppi di *K. pneumoniae* considerati sono risultati positivi ai saggi di amplificazione condotti con i primer OXA-48-F e OXA-48-R. Questo risultato ha confermato la presenza del gene *bla*<sub>OXA-48</sub>.

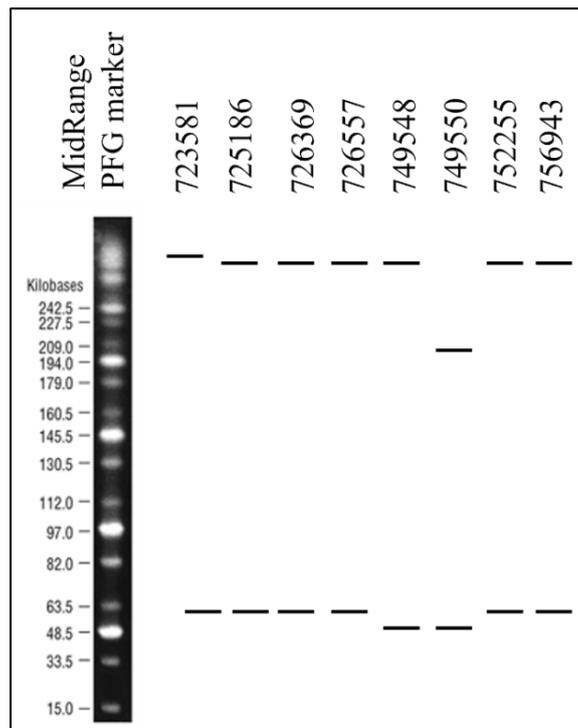
### 4.2 Tipizzazione

L'esperimento di XbaI-PFGE ha evidenziato che 4 degli 8 isolati corrispondono allo stesso clone in quanto mostrano lo stesso profilo di restrizione (pulsotipo A1) mentre gli altri 4 sono strettamente correlati ad essi, poiché presentano una banda di differenza rispetto al primo gruppo di isolati (pulsotipo A2) [**Figura 19**].

Gli esperimenti di S1-PFGE hanno mostrato la presenza di due plasmidi in tutti gli isolati, eccetto uno. Mentre la maggior parte dei ceppi possedeva due plasmidi, uno di dimensioni pari a ~57 kb, e l'altro di dimensioni di ~242,5 kb, il ceppo 749950, invece, mostrava un profilo diverso: un plasmide di ~192 kb e uno di ~50 kb. [**Figura 20**]



**Figura 19:** XbaI-PFGE: pattern delle 8 *K. pneumoniae*



**Figura 20:** S1-PFGE: profilo plasmidico degli 8 ceppi studiati

### ***4.3 Determinazione delle MIC***

Le MICs determinate mediante il metodo della microdiluizione in brodo hanno evidenziato la resistenza di tutti e 8 gli isolati ai fluorochinoloni (levofloxacin e ciprofloxacina), alle tetracicline (tigeciclina), ai carbapenemi (meropenem, ertapenem e imipenem) e alla combinazione trimetoprim-sulfametoxazolo (TMP-SXT).

Risultati eterogenei sono stati invece riscontrati per aztreonam, antibiotico appartenente alla classe dei monobattami, e per il ceftazidime, molecola della classe delle cefalosporine di terza generazione, con 2 isolati su 8 (749548 e 749550) sensibili ad entrambe le molecole.

Al contrario è stata riscontrata la suscettibilità di tutti gli isolati per amikacina (aminoglicoside), colistina (antibiotico polipeptide), cefiderocol (cefalosporina di quinta generazione) e per la combinazione ceftazidime-avibactam.

I valori di MIC ottenuti sono riassunti nella tabella sottostante [**Tabella 4**]:

OXA-48-Kp	DATI DI ISOLAMENTO			MIC (µg/ml)												
	Data	Fonte	Reparto	Colistina	Amikacina	Levofloxacina	Ciprofloxacina	TMP-SXT	Tigeciclina	Aztreonam	Meropenem	CZA	CAZ*	Ertapenem	Imipenem	Cefiderocol
723581	12/2021	Emocoltura	Gastro-enterologia	1	8	>8	>4	>320	4	>32	>8	1	>32	>2	16	0,5
725186	01/2022	Tampone rettale	Nefrologia	1	8	>8	>4	>320	4	>32	>8	1	>32	>4	4	2
726369	01/2022	Tampone rettale	Medicina generale subintensiva	1	8	>8	>4	>320	4	>32	>8	1	>32	>2	8	0,5
726577	01/2022	Tampone rettale	Medicina generale	1	8	>8	>4	>320	4	>32	>8	1	>32	>2	8	0,5
749548	04/2022	Tampone rettale	Nefrologia	2	2	>2	>2	>320	2	0,25	32	0,5	0,5	>2	16	<0,03
749550	04/2022	Tampone rettale	Rianimazione	2	1	>2	>2	>320	2	0,25	32	0,5	0,5	>2	8	<0,03
752255	05/2022	Tampone rettale	Clinica ematologica	2	4	>2	>2	>320	4	>32	32	1	>32	>2	16	0,5
756943	06/2022	Urine	Clinica ematologica	2	8	>2	>2	>320	4	>32	32	1	>32	>2	>32	1

\*CAZ: ceftazidime

#### ***4.4 Sequenziamento ed analisi di sequenza***

Il sequenziamento Nanopore è stato condotto su tutti e 8 i campioni dello studio mediante un'unica corsa: i dati di sequenziamento ottenuti hanno permesso di raggiungere una cover del genoma di ogni ceppo superiore al 40X.

##### ***4.4.1 MLST***

L'analisi MLST dei ceppi ha permesso di risalire al Sequence Type (ST). Il software ha individuato per i sette geni i seguenti alleli in tutti e 8 gli isolati:

- gapA\_3
- infB\_1
- mdh\_2

- *pgi\_4*
- *phoE\_1*
- *rpoB\_1*
- *tonB\_4*

La sequenza allelica dei geni così riportati riconduce al ST395.

#### ***4.4.2. PlasmidFinder***

Il *PlasmidFinder* permette di individuare i plasmidi presenti nella sequenza genomica attraverso l'individuazione di gruppi d'incompatibilità.

In questo caso tutti e 8 i ceppi presentano 3 gruppi di incompatibilità in 3 diversi plasmidi: IncHI1B, IncR e Col440II.

IncHI1B è il gruppo di incompatibilità riconducibile al plasmide più grande, la cui lunghezza è di 258 kb in 7 ceppi su 8, mentre nel campione 749550 ha una dimensione più piccola, 192 kb. L'analisi mediante BLAST ha rivelato che in entrambi i casi, i plasmidi individuati nei ceppi mostravano elevata omologia di sequenza con il plasmide pNDM-MAR (NCBI accession number: NC\_016980.1), pur risultando più piccoli.

Il secondo gruppo di incompatibilità individuato è IncR, riscontrato nei plasmidi da 57 kb in 6 campioni e 50 kb nei ceppi 749550 e 749548.

All'interno di questo plasmide è contenuta la maggior parte dei geni di resistenza e in particolare il gene *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Infine, il gruppo di incompatibilità Col440II è presente nel plasmide più piccolo di sole 4 kb e uguale in tutti i genomi presi in considerazione, che non era risultato visibile con gli esperimenti di S1-PFGE.

#### ***4.4.2.1. Ricostruzione e confronto tra plasmidi***

Gli assemblaggi delle reads hanno permesso uno studio approfondito delle sequenze dei plasmidi presenti, in particolare su IncHI1B e su IncR.

Il plasmide IncHI1B è presente in tutti i campioni con una dimensione di 258 kb e conferisce loro diversi geni di virulenza: il cluster genico responsabile della resistenza agli ioni tellurio, il gene per la sintesi dell'aerobactina, un secondo sideroforo che il batterio utilizza per ottenere il ferro dalla ferritina, e il recettore ferrico dell'aerobactina. Fa eccezione il ceppo 749550, dove il plasmide raggiunge le 192 kb a causa della perdita della regione che porta la resistenza al tellurio.

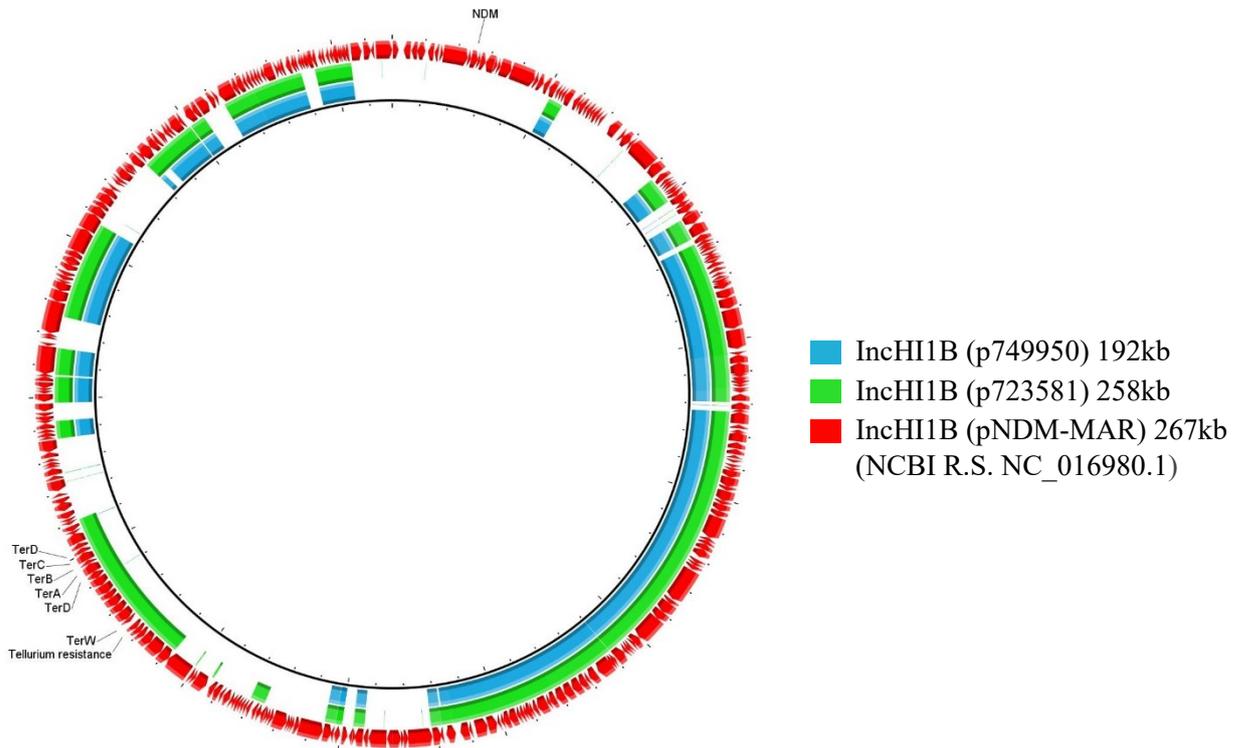
Ma in entrambi i casi è assente la porzione del trasposone che porta la  $\beta$ -lattamasi NDM, che al contrario è presente nel plasmide con maggiore similarità pNDM-MAR.

OXA-48 Kp	Gruppi di incompatibilità	Geni di virulenza
723581	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
725186	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
726369	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
726557	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
749548	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (50 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
749550	IncHI1B (pNDM-MAR) (192 kb) IncR (50 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA iucC
752255	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC
756943	IncHI1B (pNDM-MAR) (258 kb) IncR (57 kb) Col440II (4 kb)	→ iutA terC iucC

**Tabella 5:** Gruppi di incompatibilità e geni di virulenza di *OXA-48 Kp*

Con il software Brig è stato possibile confrontare graficamente i plasmidi IncHI1B, prendendo come riferimento il plasmide pNDM-MAR depositato su NCBI (acc. No. NC\_016980.1).

Qui di seguito la rappresentazione, che chiaramente mostra come il plasmide si è modificato: [Figura 21]



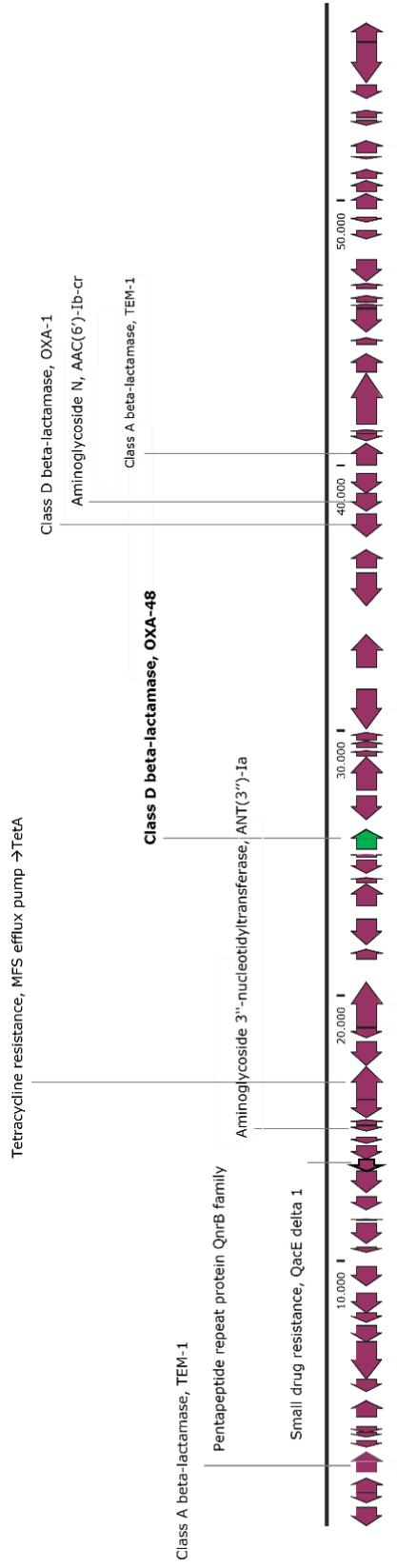
**Figura 21:** Confronto plasmidi IncHI1B

Allo stesso modo è stato studiato il plasmide IncR di 57 kb. Esso porta numerosi geni di resistenza agli antibiotici e soprattutto il trasposone *Tn1999.2* e il gene *bla<sub>OXA-48</sub>*, che conferisce la resistenza ai  $\beta$ -lattamici insieme ai determinanti *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*.

Inoltre, sono presenti i determinanti per la resistenza ai fluorochinoloni (*OqxA*, *OqxB*, *aac(6')-Ib-cr6*), agli aminoglicosidi (*aac(6')-Ib-cr*), alla tetraciclina (*tetA*) e ai farmaci antagonisti dell'acido folico come trimetoprim (*sull*, *dfrA1*).

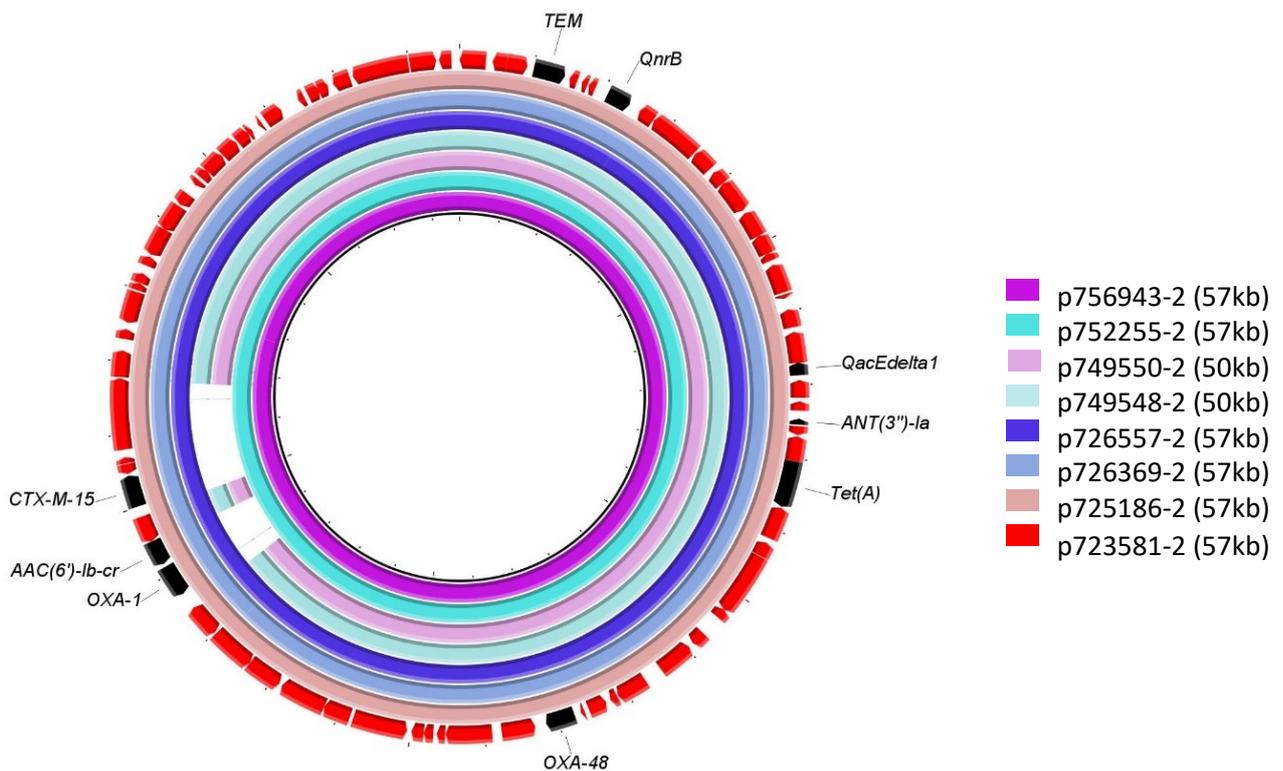
SnapGene è il software mediante il quale è stato possibile ricostruire il plasmide in forma orizzontale [Figura 22].

**Figura 22:** Rappresentazione orizzontale del plasmide IncR (57 kb)



I campioni 749550 e 749548, invece, possiedono un plasmide IncR di dimensioni ridotte (50 kb), a causa della mancanza della porzione che codifica i geni di resistenza *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> ma anche quelli per la resistenza agli aminoglicosidi (*aac(6')-Ib-cr*).

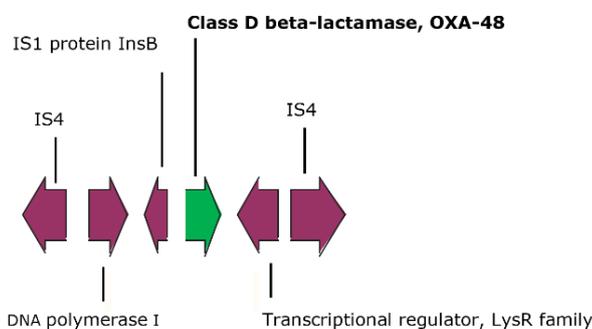
Graficamente, attraverso il software Brig, sono stati confrontati tutti gli 8 plasmidi dei campioni in analisi mettendo come plasmide di riferimento quello del primo ceppo identificato come OXA-48 positivo negli “Ospedali Riuniti” (723581) [Figura 23].



**Figura 23:** Confronto plasmidi IncR (57 kb)

Lo studio della sequenza del plasmide IncR ha permesso la ricostruzione del trasposone *1999.2* che porta il gene *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Il trasposone è costituito alle estremità da due sequenze di inserzione IS4, dalla sequenza di inserzione IS1 InsB protein, dalla DNA polimerasi I, dal regolatore di trascrizione appartenente alla famiglia LysR e dal gene codificante la OXA-48.



**Figura 24:** Ricostruzione Tn1999.2 del gene *bla*<sub>OXA-48</sub> (5876bp)

#### 4.4.3. *ResFinder*

Con il software *ResFinder* è stato possibile risalire a tutti i determinanti di resistenza presenti all'interno dei genomi. In particolare, sono stati rilevati i geni di resistenza ai  $\beta$ -lattamici, in primo luogo il gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, che codifica per l'omonima carbapenemasi. Inoltre, ci sono i geni *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a livello plasmidico e *bla*<sub>SHV-11</sub> a livello cromosomico.

Altri geni identificati sia a livello plasmidico che cromosomico codificano per meccanismi di resistenza per altre classi di antibiotici come fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetracicline, fosfomicina, folati, amfenicoli e resistenza ai sali quaternari di ammonio.

Per quanto riguarda la resistenza ai fluorochinoloni, i determinanti presenti a livello plasmidico sono *qnrS1*, il quale è una proteina che ha la funzione di protezione del bersaglio grazie all'affinità con le topoisomerasi, e *aac(6)-Ib-cr6*, che invece riesce ad inibire anche gli aminoglicosidi mediante reazione di acetilazione. A livello cromosomico associati ad un operone ci sono i geni *oxqA* e *oxqB*, i quali codificano per proteine di membrana conferendo la resistenza a fluorochinoloni, folati, amfenicoli e sali di ammonio quaternario.

La resistenza ai folati è data anche dai geni *sull* e *dfrA1* posti sul plasmide IncR.

Per la resistenza alla fosfomicina è stato rilevato il gene *fosA6* cromosomico, il quale però presenta due mutazioni a livello dell'amminoacido 130 (Q → P) e 139 (Q → E).

In tutti i campioni c'è il gene *ompk37*, che codifica per le porine di membrana, caratteristiche delle *K. pneumoniae*, responsabili della selettività nel trasporto di molecole di varie dimensioni e coinvolte anche nella resistenza ai carbapenemi.

Le pompe di efflusso sono dei determinanti di antibiotico resistenza contro carbapenemi, cefalosporine, fluorochinoloni, aminoglicosidi; in particolare nei ceppi in esame sono state rilevate le pompe di efflusso di due superfamiglie: MFS (major facilitator superfamily) come *KpnF*, *KpnG*, *KpnH*, e ABC (ATP-binding cassette).

**Tabella 6:** Geni di resistenza verso diverse classi di antibiotici  
 (FLQ = fluorochinoloni; AMG = aminoglicosidi; TET = tetracicline; AMP = amfenicoli; QAC = composti di ammonio quaternario;  
 EPI = inibitori di pompe di efflusso)

OXA-48 Kp	GENI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA									
	β-LATTAMICI	FLQ	AMG	TET	FOS	FOLATI	AMP	QAC	EPI	
723581	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnE KpnG LptD OmpK37	
725186	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnG LptD	
726369	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnG KpnH LptD OmpA OmpK37	
726557	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnE KpnG LptD OmpK3	
749548	blaOXA-48 blaTEM-1 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1	-	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnE KpnG LptD OmpK37	
749550	blaOXA-48 blaTEM-1 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1	--	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnG KpnH LptD OmpK37	
752255	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnE KpnH KpnG LptD OmpK37	
756943	blaOXA-48 blaTEM-1B blaOXA-1 blaCTX-M-15 blaSHV-11	OxqA OxqB qnrS1 aac(6')-Ib-cr6	aac(6')-Ib-cr	ΔtetA	fosA6 (Q130P Q139E)	OxqA OxqB sul1 dfrA1	OxqA OxqB	OxqA OxqB qacEdelta1	KpnF KpnE KpnH KpnG LptD OmpK37	

#### **4.4.4. VirulenceFinder**

VirulenceFinder è il software in grado di rilevare i geni di virulenza.

A livello cromosomico sono stati individuati diversi geni di virulenza tra cui *fimH*, responsabile della sintesi della fimbria di tipo 1; *fyuA*, individuato per la prima volta in *Yersinia pseudotuberculosis* e permette la sintesi dei recettori dei siderofori e *irp2*, coinvolto nella sintesi di proteine ad alto peso molecolare necessarie per regolare i livelli di ferro all'interno del batterio.

Il gene di virulenza *iutA*, al contrario è presente in doppia copia, una nel cromosoma e una nel plasmide IncHI1B. Si tratta di un gene codificante per il recettore dell'aerobactina ferrica, identificato inizialmente in *E. coli* e responsabile della regolazione del trasporto degli ioni ferro attraverso la membrana.

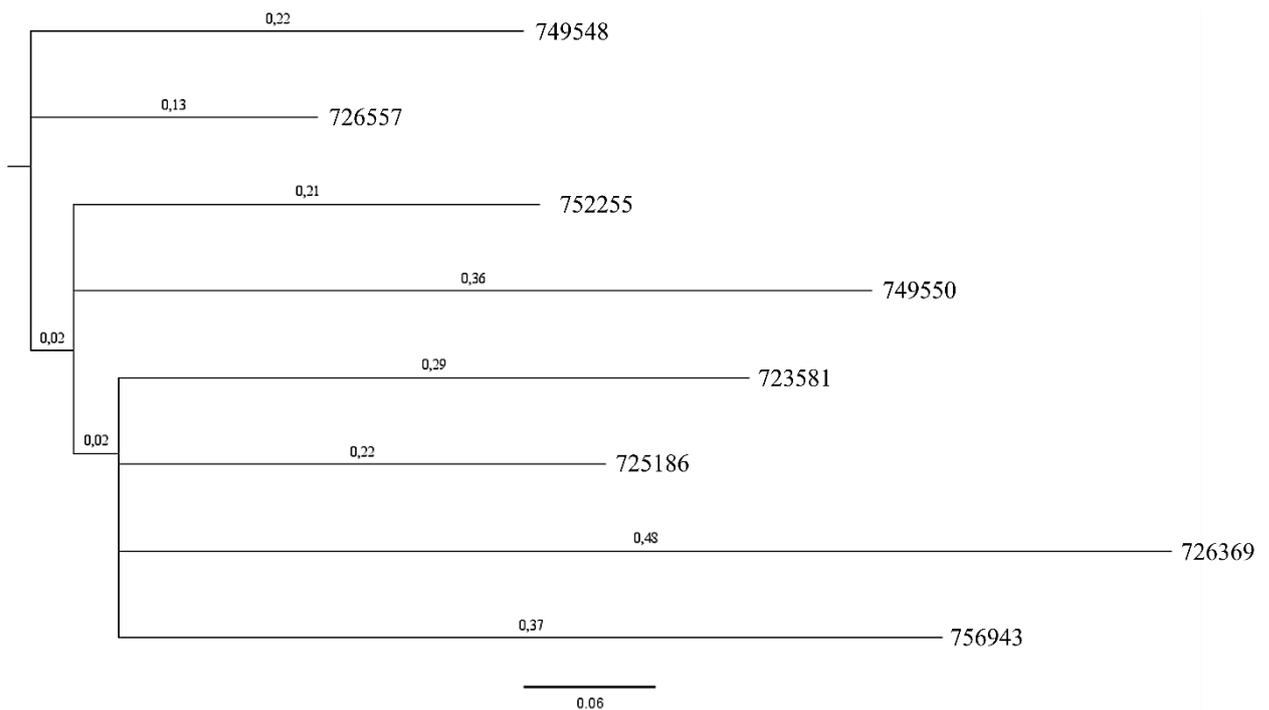
Nel plasmide IncHI1B ci sono altri due geni di virulenza: *terC*, che codifica per proteine che conferiscono la resistenza al tellurio, e *iucC* che permette la sintesi dell'aerobactina.

#### **4.4.5. CSIPhylogeny**

Il sequenziamento dei campioni effettuato mediante la tecnologia "Nanopore" ha reso possibile la costruzione dell'albero filogenetico con il software *CSIPhylogeny*.

L'albero è stato costruito con il metodo "maximum likelihood", per cui si ricerca la miglior topologia e lunghezza dei rami, che massimizza la probabilità di generare le sequenze osservate.

Prendendo come genoma di riferimento quello del primo ceppo identificato come OXA-48 positivo è possibile osservare come nel tempo la *K. pneumoniae* ST395 ha mantenuto le stesse caratteristiche genotipiche. Le distanze filogenetiche individuate infatti sono estremamente limitate e confermano l'appartenenza dei ceppi ad un singolo evento clonale (figura 25).



**Figura 25:** Albero filogenetico delle *K. pneumoniae* OXA-48

Data la percentuale di errore del sequenziamento “Nanopore”, sono stati utilizzati gli assemblaggi ibridi (sequenze Nanopore + sequenze Illumina) per verificare l’effettiva somiglianza tra i ceppi in esame. In questo caso sono stati presi in esame il primo ceppo isolato durante lo studio (723581) e l’ultimo ceppo (756943).

La tabella degli SNP (Single nucleotide polymorphisms) mostra un massimo di 14 SNP tra un ceppo e l’altro, a dimostrazione della vicinanza genotipica.

## 5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni l'incidenza di batteri multiresistenti in isolati clinici è aumentata in maniera esponenziale e la loro capacità di trasferire rapidamente determinanti di resistenza agli antibiotici, favorita anche dalla loro localizzazione per lo più plasmidica, li ha resi uno dei problemi di sanità pubblica più importanti da affrontare.

Tra i Gram negativi, le specie EPA occupano una posizione di rilievo sia in ambito nosocomiale che comunitario in quanto la loro diffusione è favorita rispettivamente dall'utilizzo di strumenti e dispositivi medici non adeguatamente sterilizzati e da cibo e acqua contaminati. La pressione selettiva a cui questi microrganismi sono sottoposti in ambito ospedaliero non fa altro che aumentare il tasso di diffusione dell'antibiotico-resistenza che viene sostenuta dalla capacità di scambiare materiale genetico sia tra ceppi della stessa specie che tra specie diverse sfruttando meccanismi di trasferimento genico orizzontale e di trasposizione. (*Diene et al., 2014*).

Una delle specie batteriche più complicate da trattare e maggiormente diffuse in ambito nosocomiale posta sotto ai riflettori è la *K. pneumoniae* (*Paczosa and Meczars, 2016*).

Le infezioni sostenute da *K. pneumoniae* sono estremamente difficili da trattare sia per i numerosi fattori di virulenza che questa specie è in grado di

esprimere, sia per le limitate scelte terapeutiche che possono essere impiegate in queste infezioni. I carbapenemi rappresentano un *last resort antibiotic* per il trattamento di infezioni da Gram negativi: queste molecole sono resistenti all'azione delle più diffuse  $\beta$ -lattamasi, causano pochi effetti collaterali e possiedono un profilo farmacocinetico estremamente favorevole che ne permette la diffusione a quasi tutti i tessuti e fluidi corporei (Zhanel, 2007 D). Negli ultimi anni il trattamento delle infezioni sostenute da *K. pneumoniae* è diventato ancora più complicato a causa della produzione e diffusione di enzimi in grado di idrolizzare e inattivare i carbapenemi (Stewart et al., 2018). La rapida diffusione delle carbapenemasi è strettamente correlata alla localizzazione dei geni che le codificano. Questi, infatti, molto spesso si trovano inseriti in trasposoni che ne favoriscono la diffusione. In Italia, la situazione riguardante le *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi è alquanto preoccupante: gli ultimi dati EARS-net rilevano un tasso di incidenza del 26.7% (Surveillance Atlas of Infectious Disease, ECDC). Il principale meccanismo riscontrato per la resistenza ai carbapenemi è la KPC: l'ultimo report italiano sulla diffusione delle carbapenemasi indica che il 96.1% degli isolati resistenti ai carbapenemi esprimeva il gene *bla<sub>KPC</sub>* (Di Pilato et al., 2021).

La diffusione di *bla*<sub>OXA48</sub> invece risultava molto più contenuta: solo 3 ceppi erano positivi per questo gene. A livello europeo invece, OXA48 rappresenta il secondo meccanismo di resistenza ai carbapenemi più diffuso dopo KPC (David *et al.*, 2019). La distribuzione di questo meccanismo però è fortemente influenzata dalla regione geografica: alcuni paesi, infatti, presentano tassi di diffusione di ceppi OXA-48 particolarmente elevati. *bla*<sub>OXA48</sub> risulta particolarmente diffuso in Spagna, Romania e Turchia (David *et al.* 2019 Nature Microbiology), mentre sono state individuate situazioni endemiche nei paesi della fascia sub-sahariana come Marocco, Tunisia, Libia ed Egitto (Lee *et al.*, 2016).

L'elevata diffusione di *bla*<sub>OXA-48</sub> è stata sostenuta da diversi outbreaks di ceppi OXA48-produttori che sono stati individuati a partire dal 2006. Il primo evento epidemico si è verificato ad Instambul (Turchia), dove *bla*<sub>OXA48</sub> è endemico (Carrer *et al.*, 2008), ma negli anni successivi outbreaks analoghi sono stati individuati in paesi con bassi tassi di circolazione di OXA48: nel 2012 in Germania (Kola *et al.*, 2015), successivamente in Olanda (Hidalgo *et al.*, 2019) e nel 2020 in Gran Bretagna (Lim *et al.*, 2020). In tutti i casi il gene *bla*<sub>OXA-48</sub> si trova nel trasposone *Tn1999* e nella sua variante *Tn1999.2*, che possiede una sequenza d'inserzione in più localizzata a monte del gene codificante la carbapenemasi (Hidalgo *et al.*, 2019).

Il nostro studio ha individuato l'insorgenza di un outbreak di *K. pneumoniae* OXA48-produttore presso gli "Ospedali Riuniti" di Ancona. Come nel caso dei paesi a basso tasso di circolazione di OXA48, anche nel nostro ospedale si è assistito ad una rapida insorgenza di ceppi positivi per questo determinante di resistenza, che dall'inizio della sorveglianza sulle carbapenemasi isolati da tampone rettale non era mai stato individuato. È anche interessante notare che la maggior parte dei ceppi sono stati isolati da tampone rettale e non da campione biologico collegato ad un'infezione: la sede enterica può suggerire che la diffusione di questo particolare ceppo potrebbe essere dovuta a portatori sani di *K. pneumoniae* OXA48 nelle feci piuttosto che ad outbreak infettivi.

Per quanto riguarda la collocazione genetica, nell'outbreak in esame il gene *bla*OXA48 è inserito nel trasposone *Tn1999.2* che è a sua volta incorporato all'interno del plasmide IncR da 57 kb, rimasto identico in quasi tutti i campioni analizzati. Fanno eccezione i due ceppi con fenotipo diverso (749548 e 749550), sensibili all'aztreonam e al ceftazidime, che hanno un plasmide più piccolo dovuto alla perdita delle porzioni con i geni *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. La perdita del cluster contenenti questi ultimi due geni è la ragione per la quale questi isolati si dimostrano sensibili ad aztreonam e ceftazidime. Questa modificazione del plasmide sembra appartenere ad una

deriva genetica che poi non ha avuto successo, tanto che gli isolati collezionati successivamente non presentavano questa delezione.

Sebbene la quasi totalità degli isolamenti deriva da tampone rettale ed è indice di uno stato di portatore sano, i ceppi responsabili dell'outbreak fanno parte del ST395.

ST395 è una famiglia di *K. pneumoniae* adattata all'ambiente ospedaliero e considerata un "high-risk clone" a causa dei numerosi tratti di antibiotico-resistenza e della facilità di diffusione (Di Pilato, 2021). Questo clone è stato responsabile di numerosi outbreaks (Muggeo et al., 2018; Maida et al., 2018) e necessita un monitoraggio continuo per evitare che possa essere responsabile di infezioni a livello ospedaliero. La sua attuale distribuzione in numerosi pazienti è indice di grande adattabilità e non è possibile escludere il suo coinvolgimento in future infezioni ospedaliere.

L'avvento delle  $\beta$ -lattamasi e la diffusione delle infezioni sostenute da batteri CP-CRE ha notevolmente complicato la gestione del paziente e la scelta delle terapie antibiotiche per contrastare queste malattie: il trattamento antibiotico rimane cruciale ma estremamente complicato per la coespressione di differenti meccanismi di resistenza a diverse classi di molecole antibiotiche. Ad oggi le opzioni terapeutiche per i CP-CRE sono limitate.

Una delle ultime risorse è la tigeciclina, farmaco derivato dalla tetraciclina con azione diretta sia nei confronti dei Gram positivi che dei Gram negativi (Peterson et al., 2008). Anche nei confronti di questo nuovo antibiotico sono già stati individuati meccanismi di resistenza che coinvolgono l'espressione di pompe di efflusso, in particolare OqxA e OqxB. Come riportato nello studio di Goodarzi et al., inizialmente si era ipotizzato che la resistenza alla tigeciclina fosse dovuta ad una cross-resistenza indotta dall'utilizzo di altri antibiotici come i carbapenemi. Successivi esperimenti con il CCCP, inibitore di pompe di efflusso, hanno dimostrato un'effettiva diminuzione dei valori di MIC in presenza dell'inibitore. Di conseguenza, si è potuto confermare che la resistenza alla tigeciclina è dovuta all'espressione delle pompe di efflusso (Goodarzi et al., 2021).

Nel caso dei ceppi responsabili dell'outbreak in esame, la presenza di pompe di efflusso OqxA e OqxB spiega la resistenza alla tigeciclina riscontrata negli isolati.

Alternative antibiotiche utilizzate in monoterapia sono l'amikacina, un aminoglicoside, e la colistina, una polimixina, che hanno dimostrato un moderato successo in caso di infezioni correlate all'utilizzo di catetere, ma una limitata efficacia nelle infezioni più gravi (Stewart et al., 2018), che ne suggerisce un uso in combinazione con altre molecole antibiotiche.

I ceppi analizzati sono risultati sensibili a questi due antibiotici che però presentano un profilo di sicurezza non troppo favorevole: entrambi gli antibiotici, infatti, possono causare gravi effetti collaterali a carico del sistema renale e del sistema nervoso (*Miller and Singer, 2022; Dalhoff, 2021*) e sono quindi meno preferibili per un'eventuale terapia.

Insieme ad amikacina e colistina, un altro farmaco a cui i ceppi in esame si sono mostrati sensibili è il cefiderocol, una cefalosporina di quinta generazione che sfrutta i siderofori per entrare nella cellula batterica. Sia in vivo che in vitro i risultati di questo antibiotico sono stati soddisfacenti, con valori di MIC inferiori a 1 mg/L (*Delgado-Valverde et al., 2020*). In letteratura sono riportati casi di ceppi di *K. pneumoniae* OXA-48 resistenti al cefiderocol ma ad oggi ancora non si è riusciti ad identificare con precisione il meccanismo di resistenza (*Bianco et al., 2022*).

Altre opzioni terapeutiche sono legate all'utilizzo di inibitori delle  $\beta$ -lattamasi, che agiscono legando l'enzima rendendolo inattivo così da permettere l'azione dell'antibiotico  $\beta$ -lattamico. Gli inibitori, ad oggi, approvati sono tazobactam, sulbactam, acido clavulanico (*Sharma et al., 2016*).

La combinazione più utilizzata contro i ceppi CR è il ceftazidime/avibactam (CZA), associazione di un  $\beta$ -lattamico e di un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi non

$\beta$ -lattamico, che inibisce l'azione delle carbapenemasi di tipo A, D e C. L'avibactam ha ricevuto nel 2016 l'approvazione per essere commercializzato, ad una concentrazione fissa, con il ceftazidime (nome commerciale Zavicefta<sup>®</sup>) (Bush, 2018).

I ceppi responsabile dell'outbreak di Ancona risultano tutti sensibili all'azione del CZA, confermando i dati in letteratura di efficacia di questa combinazione nei confronti dei ceppi OXA48 produttori (Yahav et al., 2020).

Considerato l'aumento dei tassi di resistenza e la tossicità di alcune molecole antibiotiche, la combinazione di farmaci risulta essere una strategia ampiamente utilizzata per contrastare le infezioni da batteri multi-resistenti. Studi recenti hanno indagato l'efficacia della combinazione cefiderocol più CZA che però in vitro non ha dimostrato azione sinergica (Bianco et al., 2022).

Diversi studi hanno analizzato l'efficacia clinica di terapie di combinazione di antibiotici nei confronti di ceppi produttori di OXA48: i risultati hanno mostrato effetti moderatamente positivi, influenzati dal tipo di infezione, di combinazione antibiotica e dalle condizioni cliniche del paziente (Stewart et al. 2018).

Per preservare l'efficacia terapeutica di queste nuove sostanze è importante un utilizzo consapevole, ragionato e limitato alle infezioni per le quali non è

possibile utilizzare altri antibiotici. L'antibiotic stewardship rimane cruciale per evitare l'insorgere di nuove resistenze e la possibilità di sviluppo di outbreak.

Inoltre, la maggior parte delle infezioni causate da *K. pneumoniae* sono associate all'ambiente ospedaliero e all'assistenza sanitaria, dove e in questo modo la diffusione tra paziente, personale sanitario e strumenti medici è molto semplice. Di conseguenza, assumono particolare valore le campagne di sensibilizzazione sia per i pazienti che per gli operatori sanitarie e gli studi di sorveglianza volti ad individuare outbreak e diffusioni di ceppi resistenti.

Una campagna di sensibilizzazione è fondamentale per migliorare e aumentare la consapevolezza di medici, veterinari, pazienti riguardo la resistenza agli antimicrobici. Accanto alla sensibilizzazione, le sorveglianze antimicrobiche, ovvero campagne di screening per la ricerca di carbapenemasi, diventano strumenti indispensabili per individuare outbreak e limitare la diffusione di ceppi multi-resistenti. (O'Neil,2016).

Pur disponendo di armi efficaci quali gli antibiotici per combattere le infezioni batteriche, restano validi i principi di igiene che svolgono il ruolo prevalente nella prevenzione dalle infezioni. Meno persone si infettano, meno antibiotici è necessario utilizzare, minore è la pressione selettiva che imprimiamo nello sviluppo dell'antibiotico-resistenza. (O'Neil,2016).

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ✦ Ashurst JV, Dawson A. Klebsiella Pneumonia. 2022 Feb 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 30085546.
- ✦ Bianco G, Boattini M, Comini S, Casale R, Iannaccone M, Cavallo R, Costa C. Occurrence of multi-carbapenemases producers among carbapenemase-producing Enterobacterales and in vitro activity of combinations including cefiderocol, ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and aztreonam in the COVID-19 era. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022 Apr;41(4):573-580. DOI: 10.1007/s10096-022-04408-5.
- ✦ Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Sep 24;62(10):e01076-18. DOI: 10.1128/AAC.01076-18.
- ✦ Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2950-4. DOI: 10.1128/AAC.01672-07.
- ✦ Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr*. 2016 Feb;4(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.

- ✦ Dalhoff A. Selective toxicity of antibacterial agents-still a valid concept or do we miss chances and ignore risks? *Infection*. 2021 Feb;49(1):29-56. DOI: 10.1007/s15010-020-01536-y.
- ✦ David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudahab K, Goater R, Giani T, Errico G, Aspbury M, Sjunnebo S; EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group; Feil EJ, Rossolini GM, Aanensen DM, Grundmann H. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019 Nov;4(11):1919-1929. DOI: 10.1038/s41564-019-0492-8.
- ✦ Delgado-Valverde M, Conejo MDC, Serrano L, Fernández-Cuenca F, Pascual Á. Activity of cefiderocol against high-risk clones of multidrug-resistant *Enterobacteriales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jul 1;75(7):1840-1849. DOI: 10.1093/jac/dkaa117.
- ✦ Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):831-8. DOI: 10.1111/1469-0691.12655.
- ✦ Di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, Del Grosso M, Antonelli A, David S, Lindh E, Camilli R, Aanensen DM, Rossolini GM, Pantosti A;

AR-ISS Laboratory Study Group on carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Jan 19;76(2):355-361. DOI: 10.1093/jac/dkaa431.

- ✦ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2021. Stockholm: ECDC; 2022

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021>

- ✦ European Centre for Disease prevention and Control (ECDC), Surveillance report 2016.

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf>

- ✦ European Centre for Disease Prevention and Control and WHO Regional Office for Europe. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2021 data. Executive Summary. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2022.

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021-data>

- ✦ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>
- ✦ European Centre for Disease prevention and Control, Surveillance Atlas of Infectious Disease. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>
- ✦ Galani Irene, Karaikos Ilias, Karantani Irene, Papoutsaki Vassiliki, Maraki Sofia, Papaioannou Vassiliki, Kazila Polyzo, Tsorlini Helen, Charalampaki Nikoletta, Toutouza Marina, Vagiakou Helen, Pappas Konstantinos, Kyratsa Anna, Kontopoulou Konstantina, Legga Olga, Petinaki Efthymia, Papadogeorgaki Helen, Chinou Efrosini, Souli Maria, Giamarellou Helen, on behalf of the study collaborators. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. Euro Surveill. 2018;23(31):pii=1700775. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700775>

- ✦ Goodarzi R, Arabestani M, Alikhani MY, Keramat F, Asghari B. Emergence of tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone in patients without exposure to tigecycline. *J Infect Dev Ctries*. 2021 Nov 30;15(11):1677-1684. DOI: 10.3855/jidc.15157.
- ✦ Hidalgo L, de Been M, Rogers MRC, Schürch AC, Scharringa J, van der Zee A, Bonten MJM, Fluit AC. Sequence-based epidemiology of an OXA-48 plasmid during a hospital outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct 7;63(12):e01204-19. DOI: 10.1128/AAC.01204-19.
- ✦ Istituto Superiore di Sanuità (ISS)  
<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-klebsiella-pneumoniae>
- ✦ Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09.

- ✦ Kola A, Piening B, Pape UF, Veltzke-Schlieker W, Kaase M, Geffers C, Wiedenmann B, Gastmeier P. An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing *Klebsiella pneumoniae* associated to duodenoscopy. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015 Mar 25;4:8.  
DOI: 10.1186/s13756-015-0049-4.
- ✦ Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016 Jun 13;7:895.  
DOI: 10.3389/fmicb.2016.00895.
- ✦ Lim FH, Modha DE, Collins E, Westmoreland D, Ashton C, Jenkins DR. An outbreak of two strains of OXA-48 producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital. *Infect Prev Pract*. 2020 May 21;2(3):100033.  
DOI: 10.1016/j.infpip.2019.100033.
- ✦ Maida CM, Bonura C, Geraci DM, Graziano G, Carattoli A, Rizzo A, Torregrossa MV, Vecchio D, Giuffrè M. Outbreak of ST395 KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018 Apr;39(4):496-498.  
DOI: 10.1017/ice.2017.267.

- ✦ Miller M, Singer M. Do antibiotics cause mitochondrial and immune cell dysfunction? A literature review. *J Antimicrob Chemother.* 2022 Apr 27;77(5):1218-1227. DOI: 10.1093/jac/dkac025.
- ✦ Muggeo A, Guillard T, Klein F, Reffuveille F, François C, Babosan A, Bajolet O, Bertrand X, de Champs C; CarbaFrEst Group. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Jun;13:98-103. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.023.
- ✦ Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 Jun 15;80(3):629-61. DOI: 10.1128/MMBR.00078-15.
- ✦ Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):4943-60. DOI: 10.1128/AAC.00296-11.
- ✦ Peterson LR. A review of tigecycline--the first glycylcycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Dec;32 Suppl 4:S215-22. doi: 10.1016/S0924-8579(09)70005-6. PMID: 19134522.
- ✦ Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1597-606. DOI: 10.1093/jac/dks121.

- ✦ Sattler J, Tsvetkov T, Stelzer Y, Schäfer S, Sommer J, Noster J, Göttig S, Hamprecht A. Emergence of Tn1999.7, a New Transposon in blaOXA-48-Harboring Plasmids Associated with Increased Plasmid Stability. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Nov 15;66(11):e0078722. DOI: 10.1128/aac.00787-22.
- ✦ Stewart A, Harris P, Henderson A, Paterson D. Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Oct 24;62(11):e01195-18. DOI: 10.1128/AAC.01195-18.
- ✦ Sharma R, Park TE, Moy S. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. *Clin Ther.* 2016 Mar;38(3):431-44. DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.01.018.
- ✦ Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel).* 2019 Aug 19;8(3):122. DOI: 10.3390/antibiotics8030122.
- ✦ Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance.  
 Chaired by Jim O’neill  
[https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper%20with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper%20with%20cover.pdf)

- ✦ Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.  
DOI: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
- ✦ van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017 May 19;8(4):460-469.  
DOI: 10.1080/21505594.2016.1222343.
- ✦ WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>
- ✦ World Health Organisation (WHO).  
<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- ✦ Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Nov 11;34(1):e00115-20. DOI: 10.1128/CMR.00115-20.

✦ Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52. DOI: 10.2165/00003495-200767070-00006.