



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Caratterizzazione di ceppi di
Enterobatteri resistenti ai carbapenemi,
non produttori di carbapenemasi, isolati
da campioni fecali umani**

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Marina Mingoia

Tesi di Laurea di:
Andrea Romani

Correlatore:
Dott.ssa **Gloria Magi**

A.A. 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	2
1.1 Le β -lattamasi. Generalità e classificazione.....	7
1.2 Scopo della ricerca.....	10
2. MATERIALI E METODI.....	11
2.1 Ceppi batterici, principali terreni di coltura e sostanze chimiche utilizzate.....	11
2.2 Determinazione del resistotipo.....	14
2.2.1 Antibiogramma.....	14
2.2.2 Minima concentrazione inibente (MIC).....	15
2.3 Estrazione DNA genomico.....	17
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	18
2.4.1 Applicazione di PCR e PCR multiplex per la ricerca di geni <i>bla</i>	20
2.5 Elettroforesi su gel di agarosio.....	22
2.6 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	23
3. RISULTATI.....	26
3.1 Profilo di resistenza agli antibiotici (resistotipo).....	26
3.2 Analisi del resistoma (geni di β -lattamasi).....	29
3.3 Tipizzazione genomica mediante XbaI-PFGE.....	31
4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	33
4.1 Conclusioni.....	34
5. BIBLIOGRAFIA.....	36

1. INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha identificato la resistenza antimicrobica (AMR) come uno dei tre problemi più importanti al mondo per la salute dell'uomo.

Un continuo aumento dell'impatto dell'AMR comporterebbe costi umani ed economici estremamente elevati.

Senza un intervento coordinato a livello mondiale entro il 2050 sono previsti 10 milioni di morti ogni anno per malattie da batteri resistenti (attualmente sono 700.000 i decessi annuali) e una riduzione dal 2% al 3.5% del Prodotto Interno Lordo (PIL) con un costo mondiale di 100 trilioni di dollari (O'Neill J, 2014).

Per questo nel 2015 l'OMS ha redatto un piano d'azione che prevede il coordinamento tra numerosi settori e attori internazionali; senza un'azione armonizzata e immediata su scala globale il mondo si dirige verso un'ora post-antibiotica in cui infezioni comuni potrebbero tornare ad uccidere (WHO, 2015).

Con l'aumento dell'AMR si sta perdendo tutto il vantaggio guadagnato nel secolo scorso nella cura delle malattie infettive, e nella prevenzione delle stesse in soggetti fragili con altre patologie, in interventi medici o procedure diagnostiche invasive, ad es: 1) la lotta contro malattie infettive tuttora potenzialmente letali come polmonite, tubercolosi, HIV e malaria, 2) la battaglia contro condizioni come cancro, dove gli antibiotici sono fondamentali per aiutare la chemioterapia, ed i pazienti evitano e combattono l'infezione, 3) enormi progressi in procedure chirurgiche come trapianti di organi e tagli cesarei, che ora sono diventati procedure di routine a basso rischio grazie alla capacità di prevenire o curare efficacemente le infezioni acute con antibiotici (O'Neill J, 2016).

Nel 2017, l'OMS ha pubblicato la *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS*, con lo scopo di identificare i più importanti batteri resistenti a livello globale per i quali c'è urgente bisogno di nuovi trattamenti (Tabella 1).

PRIORITÀ 1: CRITICA	PRIORITÀ 2: ALTA	PRIORITÀ 3: MEDIA
<i>Acinetobacter baumannii</i> , carbapenem-R	<i>E. faecium</i> (VRE) <i>S. aureus</i> (MRSA, VISA, VRSA)	<i>S. pneumoniae</i> (PenNS)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenem-R	<i>H. pylori</i> (clarithromycin-R) <i>Campylobacter</i> spp. FQs-R	<i>H. influenzae</i> Amp-R
<i>Enterobacteriaceae</i> * carbapenem-R, ESBL-producing (<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i>)	<i>Salmonella</i> (FQs-R) <i>N. gonorrhoeae</i> (cephalosporin-R, FQs-R)	<i>Shigella</i> spp. Fqs-R

Tabella 1: **Enterobacteriaceae* include: *K. Pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., e *Providencia* spp., *Morganella* spp. (WHO, 2017).

Dalla tabella possiamo evincere che il gruppo di priorità 1 include tutti quei batteri che sono resistenti ai carbapenemi, in particolare i batteri produttori di carbapenemasi. Questo perché i carbapenemi sono antibiotici di ultima generazione, per la prevenzione e il trattamento di infezioni sostenute da numerosi batteri *multidrug resistant* (MDR). In particolare, le infezioni da *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* (CRE) sono associate ad elevata mortalità, principalmente a causa dei ritardi nella somministrazione di un trattamento efficace e della limitata disponibilità di opzioni terapeutiche (ECDC, 2019). Nell'ambito dei ceppi CRE, di particolare rilevanza è l'individuazione dei cosiddetti ceppi *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* (CPE), in quanto la produzione di carbapenemasi, vale a dire enzimi in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico di questi antibiotici, è il meccanismo più diffuso di resistenza acquisita ai carbapenemi ed il più importante a livello clinico.

Gli altri meccanismi in grado di conferire resistenza ai carbapenemi e spesso in associazione tra loro sono: (1) iperproduzione di β -lattamasi tipo AmpC; (2) produzione di *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL), (3) perdita/modificazione delle porine della membrana esterna; (4) sovrapproduzione delle pompe di efflusso (Iovleva, 2017). A differenza delle carbapenemasi o delle ESBL, altri meccanismi di resistenza sono meno trasmissibili tra i ceppi, ad esempio la presenza di porine mutanti deficitarie potrebbero avere efficienza ridotta e una minor capacità di diffusione nelle strutture sanitarie.

Viceversa, sebbene i ceppi CRE rappresentino delle importanti sfide terapeutiche, i ceppi CPE risultano ancora più significativi sia nella prevenzione che nel trattamento delle infezioni, dal momento che i geni codificanti per le carbapenemasi sono principalmente localizzati su plasmidi che hanno capacità di trasferirsi da una specie all'altra (Iovleva, 2017) per trasferimento genetico orizzontale.

In Italia il fenomeno è particolarmente preoccupante per il costante aumento di isolati clinici CRE a partire dal 2010 che ha portato alla situazione endemica attuale.

I ceppi produttori di carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae* sono stati ormai identificati in tutto il mondo. Le principali carbapenemasi sono KPC, VIM, NDM e OXA-48, appartenenti alle classi A, B, e D della classificazione di Ambler (Ambler, 1980).

Klebsiella pneumoniae KPC-produttore è stata la prima specie resistente ad emergere e a diffondersi a livello globale a partire dalla prima segnalazione nel 1996 nella Carolina del Nord (Yigit, 2001).

Gli enzimi KPC sono attualmente le carbapenemasi predominanti in *Enterobacteriaceae* (Livermore, 2012).

Dal 2006, i ceppi di *K. pneumoniae* KPC-produttori si sono diffusi dapprima negli USA, e successivamente in Israele, Grecia, Italia, per poi diffondersi in altri paesi europei e con focolai in crescita in Cina, Brasile (Livermore, 2012).

Parallelamente all'espansione di KPC, è stata riportata l'emergenza di un altro gruppo di carbapenemasi, OXA-48, che si è dapprima diffuso principalmente in *K. pneumoniae* nei paesi mediterranei (Iovleva, 2017). In particolare, OXA-48 è stato identificato per la prima volta da un isolato di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi recuperato a Istanbul, in Turchia, nel 2001 (Poirel, Potron, Nordmann, 2012). Successivamente, OXA-48 è stata riportata in altri Paesi del Medio Oriente e del Nord Africa, il più delle volte da isolati di *K. pneumoniae*. Ceppi produttori di OXA-48 sono stati identificati sporadicamente in diversi paesi europei tra cui Francia, Germania, Paesi Bassi, Italia, Belgio, Regno Unito, Irlanda, Slovenia, Svizzera e Spagna (Poirel, Potron, Nordmann, 2012)

L'identificazione dell'enzima NDM (*New Delhi* metallo- β -lattamasi) è piuttosto recente. Ceppi di *K. pneumoniae* ed *E. coli* produttori di NDM sono stati identificati per la prima volta in un paziente indiano residente in Svezia che era stato ricoverato in ospedale a Nuova Delhi per una infezione del tratto urinario, prima di tornare in Svezia all'inizio del 2008 (Yong, 2009). La carbapenemasi NDM type da allora si è diffusa rapidamente nell'Asia meridionale e anche a livello globale (Iovleva, 2017). I principali serbatoi di NDM sono *K. pneumoniae* ed *Escherichia coli* nel subcontinente indiano (Nordmann, 2014). Ceppi *Enterobacteriaceae* produttori di NDM sono sempre più segnalati anche in Cina, ma l'epidemiologia complessiva al momento non è ancora chiara, perché la loro prevalenza tipicamente segnalata da ospedali singoli o locali (Iovleva, 2017). Al momento attuale, i ceppi NDM-positivi sono stati segnalati in diversi paesi, compresi gli Stati Uniti, enfatizzando una

capacità di diffondere a livello mondiale ben più rapida di quanto si è verificato con i ceppi produttori di KPC.

Nella definizione dei gruppi di priorità da parte dell'OMS (WHO, 2017), tra i patogeni MDR aventi priorità 1 (critica) e facenti parte della famiglia *Enterobacteriaceae* sono stati considerati, oltre alle specie *K. pneumoniae* ed *E. coli*, tutti i ceppi resistenti ai carbapenemi (CRE), tra cui anche la tribù dei *Proteae* che comprende i generi *Proteus* spp., *Morganella* spp., e *Providencia* spp. (WHO, 2017). Questi enterobatteri rappresentano una sfida particolare a causa della loro resistenza intrinseca alla colistina e alla ridotta sensibilità all'imipenem. Oltre alla resistenza naturale, le *Proteae* hanno spiccata tendenza ad acquisire molteplici geni di resistenza attraverso la trasmissione orizzontale, per questi motivi la terapia antimicrobica delle infezioni causate da questi microrganismi può essere complicata.

Da luglio 2017 ad aprile 2019 è stato condotto uno studio negli ospedali universitari della Romania occidentale in cui sono stati isolati (principalmente da tamponi di ferite e aspirati bronchiali) ed analizzati 400 ceppi di *Proteae* di cui: il 64% appartenente al genere *Proteus*, il 26,75% al genere *Providencia* e il 9,25% al genere *Morganella*. Tra i 400 ceppi di *Proteae* sono stati identificati 65 ceppi CRP (*Proteae* resistente ai carbapenemi) tutti resistenti ai β -lattamici imipenem, meropenem, piperacillin, ceftazidime. Inoltre, la maggior parte di essi era resistente ai fluorochinoloni e al trimetoprim-sulfametossazolo, e presentava una ridotta suscettibilità agli aminoglicosidi, specialmente alla gentamicina. Inoltre, il 66,15% dei ceppi era resistente al cefepime (cefalosporina di quarta generazione). Tra le carbapenemasi identificate, la classe molecolare più rappresentata è stata quella delle metallo- β -lattamasi (MBL), con una netta prevalenza del tipo NDM, mentre solo due ceppi avevano il tipo VIM. Le carbapenemasi KPC e OXA-48 erano identificate meno frequentemente (Rus, 2020).

Sebbene la famiglia delle *Enterobacteriaceae* includa circa 50 generi riconosciuti, la sorveglianza CP-CRE (*Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi produttori di carbapenemasi) si è concentrata sugli organismi maggiormente associati alle infezioni cliniche: *Klebsiella* spp., *E.coli*, *Enterobacter* spp. I ceppi CRE appartenenti a generi meno comuni generalmente non vengono sottoposti ai test di screening ospedalieri, in parte perché possiedono una resistenza intrinseca all'imipenem e in parte perché esprimono carbapenemasi specie-specifiche. Tuttavia, questi organismi possono anche ospitare carbapenemasi mediate da plasmidi e meritano una maggiore attenzione.

Un rapporto del *Minnesota Department of Health (MDH) Public Health Laboratory* descrive CP-CRE da generi meno comuni; dal 1° gennaio 2014 al 25 maggio 2017, il CDC ha identificato 1039 CP-CRE di cui 63 (6,1%) dei generi meno comuni. Gli isolati dei generi meno comuni

provengono da 23 stati diversi. La combinazione organismo-meccanismo maggiormente identificata è stata KPC prodotta da *Citrobacter* spp (27; 49,2%). Un'altra indagine effettuata dal 1° gennaio 2014 al 30 settembre 2017, dimostra che 149 di 1241 CRE presentate producevano carbapenemasi, Tra i 149 isolati di CP-CRE 20 (13,4%) provenivano da generi meno comuni. Le combinazioni organismo-meccanismo più comuni tra i generi meno comuni sono state: *Providencia rettgeri* produttore di IMP (7; 35%) e *Citrobacter freundii* produttore di KPC (6; 30%).

Le diverse segnalazioni suggeriscono di porre una maggiore attenzione ai ceppi CRE di generi non comuni e di estendere la richiesta di test di produzione di carbapenemasi nei laboratori di Sanità Pubblica, al fine di migliorare le pratiche di controllo delle infezioni e prevenire la diffusione di questi meccanismi di resistenza (Maroya S. Walters et al, 2018).

1.1 LE β -LATTAMASI: GENERALITÀ E CLASSIFICAZIONE

Uno dei principali meccanismi di resistenza agli antibiotici beta-lattamici è rappresentato dalla produzione di enzimi inattivanti, le β -lattamasi. In base alla struttura chimica i β -lattamici sono distinti in quattro categorie: (1) penicilline (es. penicillina, ampicillina, oxacillina), (2) cefalosporine (es. ceftazidime, ceftriaxone, cefepime) (3) monobattami (aztreonam) e (4) carbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem). Tutti i β -lattamici hanno azione battericida e condividono lo stesso meccanismo d'azione; bloccano la sintesi della parete cellulare inibendo la reazione di transpeptidazione, coinvolta nella formazione di legami crociati tra i polimeri di peptidoglicano, componente essenziale di queste strutture batteriche.

Un recente *review* sulle β -lattamasi (Bush K, 2018) descrive l'emergenza e la diffusione dei quasi 3000 enzimi che condividono lo stesso meccanismo d'azione – vale a dire l'idrolisi dell'anello β -lattamico, che rappresenta il core molecolare e funzionale dei β -lattamici – ma sono differenziabili in base al substrato su cui agiscono. I geni che codificano per tali enzimi (geni *bla*) sono distribuiti sia nei Gram-positivi che nei Gram-negativi e possono essere cromosomici o plasmidici, costitutivi o inducibili.

La classificazione più accettata delle β -lattamasi è quella di Ambler del 1980 (Ambler, 1980), la quale distingue gli enzimi in quattro classi molecolari indicate con le lettere da A a D (Bush K, 2018); le classi A, C e D presentano un residuo di serina nel loro sito catalitico, mentre la classe B comprende le β -lattamasi, che hanno un residuo di zinco nel sito attivo e per questo sono definite metallo- β -lattamasi.

- **Classe A:** sono incluse in questo gruppo la carbapenemasi KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi), codificata dal gene *blaKPC*, molte β -lattamasi a spettro esteso e le *extended-spectrum β -lactamases* (ESBLs). Le β -lattamasi di classe A più importanti e diffuse (TEM, SHV e CTX-M) sono in grado di conferire resistenza alle cefalosporine di seconda e terza generazione:
 - TEM: quasi il 90% della resistenza all'ampicillina nei batteri Gram-negativi è dovuta a geni che codificano per TEM e sono a codificazione plasmidica.
 - SHV: a partire dalla prima segnalazione (SHV-1) negli anni '70 in *E. coli* (Bush K., 2018) sono state ad oggi descritte numerose varianti SHV, alcune attive verso le cefalosporine di terza generazione (Tzouveleki, 1999) i monobattami e i carbapenemi.
 - CTX-M: sono le ESBL più importanti a livello clinico e diffuse in tutto il mondo. Sono enzimi con una spiccata attività idrolitica nei confronti delle cefalosporine

a spettro esteso quali cefotaxime (da qui il nome CTX-M), ceftazidime e ceftriaxone.

Rientrano nella classe A altri enzimi (SME, GES, PER, VEB) che sebbene di riscontro sporadico sono stati associati ad episodi epidemici.

- **Classe B:** comprende le metallo β -lattamasi (MBL), le quali utilizzano un cofattore enzimatico metallico (solitamente Zn^{2+}) e sono efficaci contro penicilline, cefalosporine e carbapenemi; questi enzimi non interferiscono con i monobattami e la loro azione viene inibita da chelanti metallici come l'EDTA. Le più comuni MBL carbapenemasi includono i gruppi VIM e IMP, insieme all'emergente gruppo NDM (*New Delhi* metallo beta-lattamasi). Le MBL idrolizzano tutti i beta-lattamici (penicilline, cefalosporine, carbapenemi) eccetto l'aztreonam.
- **Classe C:** è costituita dalle cefalosporinasi, che agiscono contro penicilline e cefalosporine e che ha come capostipite AmpC, la prima β -lattamasi isolata in *E. coli*. A differenza delle altre classi, in questa non sono comprese delle carbapenemasi vere e proprie. Tuttavia, l'iperespressione di enzimi AmpC cromosomici così come l'acquisizione orizzontale, mediata da plasmidi coniugativi, di geni codificanti enzimi AmpC-like, possono contribuire alla resistenza ai carbapenemi in molti batteri.

Le cefalosporinasi di tipo AmpC idrolizzano le penicilline, le cefalosporine (anche quelle di terza generazione, ma solitamente non quelle di quarta) ed i monobattami. La resistenza è apparsa inizialmente in organismi, probabilmente in seguito a mutazioni che potrebbero aver prodotto una iperproduzione della propria beta-lattamasi cromosomica AmpC. Successivamente la resistenza è apparsa in specie batteriche prive di un enzima AmpC inducibile, come *E. coli* e *P. mirabilis*, ed è risultata essere mediata da plasmidi che codificano per beta-lattamasi a spettro esteso (Shahid et al, 2009).

In molte *Enterobacteriaceae* l'espressione di AmpC è bassa ma inducibile in risposta all'esposizione ai beta-lattamici, o nella maggior parte dei casi, la causa più comune di sovraespressione di AmpC è una mutazione dei geni che ne controllano l'induzione. I beta-lattamici differiscono nella loro capacità di induzione. Ad esempio: amoxicillina e cefalosporine sono forti induttori e buoni substrati per la beta-lattamasi dell'AmpC. Imipenem è un forte induttore ma molto più stabile per l'idrolisi. Aztreonam e cefepime sono induttori deboli e substrati deboli ma possono essere idrolizzati se viene prodotto abbastanza enzima. L'acido clavulanico invece ha uno scarso effetto inibitore sulle AmpC, anzi, talvolta può funzionare da induttore. Oltre alla quantità e all'attività intrinseca delle

beta-lattamasi, la concentrazione del substrato beta-lattamico nel periplasma è un importante determinante dello spettro di resistenza. La riduzione del numero di canali di ingresso delle porine o l'aumento dell'espressione della pompa di efflusso può ridurre l'afflusso e aumentare ulteriormente l'efficienza dell'enzima (Jacoby, 2009). I geni AmpC codificati da plasmidi sono noti dal 1989 e sono stati ritrovati in tutto il mondo sia in isolati nosocomiali che comunitari. Piccole differenze nella sequenza degli amminoacidi della beta-lattamasi AmpC hanno dato origine a diverse famiglie: CMY, ACC, DHA, MOX, ACT, FOX, LAT, MIR, CFE (Jacoby, 2009).

- **Classe D:** comprende gli enzimi OXA- β -lattamasi o oxacillinasi poiché idrolizzano più efficacemente le isossazolil-penicilline ma non idrolizzano le cefalosporine ad ampio spettro. L'enzima prototipo OXA-1 è stato identificato la prima volta in UK nel XX da XX. Le molecole derivate (*OXA-1-like superfamily*) sono oggi molto diffuse e contribuiscono alla ridotta suscettibilità a cefotaxime e cefepime in molti ceppi. A differenza degli enzimi di classe A sono scarsamente inibite o non inibite dai più comuni inibitori β -lattamici quali acido clavulanico, sulbactam e tazobactam, salvo poche eccezioni. Sono inoltre poco inibite dagli inibitori non β -lattamici recenti, come l'avibactam (Yoon & Jeong JAC_2021). Alcuni di questi enzimi possiedono una debole attività carbapenemasi, soprattutto in associazione ad altri fattori (es: difetti di permeabilità). Al contrario, la OXA-48 è la oxacillinasi più efficace della classe D contro l'imipenem. Idrolizza lentamente carbapenemi e cefalosporine a spettro esteso ed è scarsamente inibita dalla maggior parte degli inibitori delle β -lattamasi.

1.2 SCOPO DELLA RICERCA

In Europa si verificano annualmente 4 milioni di infezioni da germi antibiotico-resistenti che causano oltre 37 mila decessi (ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control).

In Italia nel 2019 sono stati segnalati 2457 casi di batteriemie da CPE, un risultato che mostra un trend in aumento rispetto al triennio 2016- 2018 dove sono stati registrati rispettivamente 2183, 2211 e 2213 casi di batteriemie da CPE (*Iacchini S. e al, 2019. ISS)). L'attualità e la serietà di questi dati evidenziano l'importanza di un fenomeno sempre più diffuso, ossia l'antibiotico resistenza.

Come descritto in precedenza, i batteri produttori di carbapenemasi (CPE) sono quelli a maggiore diffusione e rilevanza clinica. Tuttavia, nel gruppo di priorità 1 (critica) stilato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2017) sono inclusi tutti gli enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE), vale a dire tutti quei ceppi che dimostrano resistenza ad almeno una molecola dei carbapenemi, con meccanismi di resistenza diversi dalla produzione di specifiche carbapenemasi. Complessivamente tutti i ceppi CRE devono essere attentamente considerati poiché qualunque sia il meccanismo che sottende la resistenza, la terapia antibiotica delle infezioni è complicata, dal momento che i carbapenemi sono farmaci di ultima generazione.

Scopo di questa tesi è stato quello di studiare ceppi della famiglia *Enterobacteriaceae* precedentemente isolati da campioni fecali in seguito ad uno screening selettivo. Tutti i ceppi presi in considerazione mostravano resistenza ad almeno un carbapenemico, nonostante nessuno fosse produttore di carbapenemasi.

In un primo momento, mediante analisi fenotipiche è stato studiato il profilo di resistenza a diverse classi di antibiotici (β -lattamici e non), per poi andare a ricercare i possibili geni *bla* responsabili di tale resistotipo. Successivamente sono state utilizzate analisi genotipiche con lo scopo di evidenziare eventuali correlazioni genetiche tra i vari ceppi in esame.

2. MATERIALI E METODI UTILIZZATI

2.1 Ceppi batterici, principali terreni di coltura e sostanze chimiche utilizzati.

Per questo studio sono stati presi ceppi batterici raccolti da un precedente screening, effettuato nel 2018 presso la sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, su campioni fecali umani provenienti dall’Azienda Ospedaliera “Ospedali Riuniti” di Ancona. Da questi sono stati selezionati i ceppi resistenti ai carbapenemi non produttori di carbapenemasi escludendo quelli appartenenti al genere *Klebsiella* in quanto già precedentemente studiati. I ceppi risultanti sono stati 31: 8 *Escherichia coli*, 3 *Morganella morganii*, 2 *Proteus mirabilis*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Hafnia alvei*, 1 *Citrobacter freundii*, 2 *Klebsiella aerogenes* e 13 *Enterobacter* spp. (Tabella 2).

SPECIE	CEPPO
<i>E.coli</i>	506959
<i>E.coli</i>	52828
<i>E.coli</i>	517735-2
<i>E.coli</i>	510688
<i>E.coli</i>	521756
<i>E.coli</i>	525328
<i>E.coli</i>	528046
<i>E.coli</i>	527640
<i>C. freundii</i>	516693
<i>S. marcescens</i>	77169
<i>P. mirabilis</i>	527838
<i>P. mirabilis</i>	530175
<i>M. morganii</i>	523300
<i>M. morganii</i>	528023
<i>M. morganii</i>	530071
<i>H. alvei</i>	37377

Tabella 2. Elenco degli isolati batterici in esame, distinti in base alla specie.

Nonostante i ceppi fossero già stati precedentemente identificati mediante i sistemi biochimici API o Enterosystem24, la conferma dell’identità di specie è stata ottenuta mediante il sequenziamento del gene codificante la subunità ribosomiale 16S, utilizzando i primer universali 341 F e 907 R, mediante il sequenziatore ABI prism della SOD di Virologia.

I terreni di coltura utilizzati nelle procedure di crescita, isolamento e per la determinazione della sensibilità agli antibiotici provengono dalla ditta OXOID (Garbagnate, MI).

Agar MacConkey (MC) → è un terreno di coltura selettivo e differenziale per i batteri Gram-negativi. Gli agenti selettivi che inibiscono la crescita dei Gram-positivi sono i Sali biliari e il cristal violetto (inibisce la crescita dei Gram-positivi che sopportano la presenza di Sali biliari, come ad esempio gli enterococchi). Questo terreno contiene come unica fonte energetica il lattosio e la sua fermentazione è resa visibile da un indicatore di pH (rosso neutro). In particolare, i batteri fermentanti il lattosio (es: *E. coli*), formano colonie rosa con un'area circostante di precipitazione di Sali biliari mentre i batteri che non fermentano questo zucchero (es: *P. mirabilis*) formano colonie incolori o trasparenti (Figura 1).



Figura 1. Esempio di colture microbiche in Agar MacConkey (MC): a destra colonie lattosio-non fermentanti, a sinistra colonie lattosio-fermentanti.

Mueller Hinton Agar (MHA) → terreno di coltura non selettivo, né differenziale, utilizzato principalmente per eseguire test di sensibilità agli antibiotici (metodo della diffusione in agar) dei ceppi batterici isolati da materiali clinici. Contiene estratto di carne bovina e idrolizzato acido di caseina che forniscono azoto, vitamine, carbonio, amminoacidi, zolfo e altri nutrienti essenziali; l'aggiunta dell'amido consente di assorbire le tossine rilasciate dai batteri, in modo che non possano interferire con gli antibiotici, e di mediare il tasso di diffusione degli antibiotici stessi attraverso l'agar. Di questo terreno esiste anche la variante liquida (Mueller Hinton Broth) (MHB).

Mueller Hinton II Broth (CAMHB) → terreno liquido addizionato con ioni calcio e ioni magnesio (cation-adjusted) che viene utilizzato in procedure quantitative (metodi di diluizione in brodo). È formulato per avere un basso contenuto di timina e timidina.

BH + Glicerolo → terreno di mantenimento per la conservazione a lungo termine dei campioni. Le colture pure vengono sospese in brodo BH con l'aggiunta del 20% di glicerolo (impedisce la formazione di cristalli di ghiaccio) e mantenute a -70°C fino al momento dell'uso.

Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) → tampone di corsa impiegato nell'elettroforesi su gel di agarosio per la separazione di acidi nucleici. È composto da una soluzione di Tris-acetato ed EDTA (pH 8.0). Viene preparata una soluzione di lavoro (1X) a partire dalla soluzione madre 50X.

- TAE - Soluzione Stock (50X):

Tris base	242 gr
EDTA 0,5M pH 8	100 ml
Acido Acetico Glaciale	57,1 ml
H ₂ O ultrapura	fino raggiungere 1000 ml

Tampone Tris-borato-EDTA (TBE): tampone di corsa impiegato nella PFGE composto da tris-borato ed EDTA (pH 8,3). Viene preparata una soluzione di lavoro (0,5X) a partire dalla soluzione madre 10X. Ha una capacità tamponante migliore e fornisce una più accurata risoluzione rispetto al buffer TAE.

- TBE- Soluzione stock (10X):

Tris base	107,81 gr
EDTA	3,72 gr
Acido Borico	55,04 ml
H ₂ O ultrapura	fino raggiungere 100 ml

2.2 Determinazione del resistotipo

Per la determinazione della resistenza agli antibiotici sono state utilizzate le seguenti tecniche:

2.2.1 Antibiogramma: esame microbiologico qualitativo utilizzato per saggiare *in vitro* la sensibilità dei microrganismi agli antibiotici, mediante la procedura di diffusione in agar, secondo le direttive proposte dall' European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

Procedimento:

- 1) Per una corretta procedura è necessario lavorare con colture pure e fresche; per prima cosa, si seminano e si fanno crescere i ceppi in esame in terreno selettivo MC overnight a 37°C.
- 2) Dalla coltura pura si prepara un inoculo standardizzato con densità ottica (misurata alla lunghezza d'onda di 625 nm) di 0.1, corrispondente a circa 1×10^8 Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml). Per fare ciò si preleva qualche colonia con un tampone sterile e si stempera in brodo MHB, si misura la densità ottica (tramite spettrofotometro) per assicurarsi che ricada nell'intervallo di accettabilità (0.08-0.120); in caso contrario il campione viene diluito.
- 3) L'inoculo standardizzato viene poi prelevato mediante tampone sterile e distribuito in modo uniforme sulla superficie di piastra di MHA.
- 4) I dischetti di antibiotici da saggiare vengono posizionati sterilmente sulla superficie della piastra che successivamente viene incubata in aerobiosi a 37°C per 24 h.

Gli antibiotici saggiati sono riportati nella Tabella 3 insieme alle concentrazioni dei dischetti e ai diametri di breakpoint (EUCAST, 2021)

ANTIBIOTICO	Concentrazione dischetto (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
		S ≥	R <
Amoxicillina + Acido clavulanico (AUG)	20 + 10	19	19
Aztreonam (ATM)	30	26	21
Ceftazidime (CAZ)	10	22	19
Cefotaxime (CTX)	5	20	17
Cefepime (FEP)	30	27	24
Cloramfenicolo (CHL)	30	17	17
Ciprofloxacina (CIP)	5	25	22
Gentamicina (CN)	10	17	17
Ertapenem (ETP)	10	25	25
Fosfomicina (FOS)	200	21	21
Imipenem (IMP), <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	10	22	19
Imipenem (IMP), <i>Morganellaceae</i>	10	50	19
Levofloxacina (LEVO)	5	23	19
Meropenem (MER)	10	22	16
Trimetoprim- sulfametoxazolo (SXT)	1.25-23.75	14	11

Tabella 3. Valori di riferimento per l'interpretazione dei diametri di inibizione di *Enterobacterales* (EUCAST, 2021).

2.2.2 Minima concentrazione inibente (MIC): la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita visibile. Per determinare la MIC si effettua un test di micro-diluizione in piastra microtiter da 96 pozzetti con terreno liquido, seguendo procedure standard (CLSI, 2015). È un esame microbiologico quantitativo utilizzato per valutare la sensibilità dei ceppi agli antibiotici.

Gli antibiotici saggiati sono stati: Imipenem (IMP), Ertapenem (ETP), Meropenem (MER), Aztreonam (ATM), Cefepime (FEP), Gentamicina (GEN), Ciprofloxacina (CIP), Colistina (COL), Cloramfenicolo (CHL), Amikacina (AK).

Procedura:

- 1) Seminare il ceppo da testare e il ceppo ATCC di controllo in terreno MC e incubare overnight a 37°C.
- 2) Mediante una pipetta multicanale dispensare 50 µl di CAMHB in tutti i pozzetti della piastra microtiter eccetto la prima colonna. Successivamente preparare l'antibiotico in CAMHB ad una concentrazione doppia rispetto a quella più alta che si vuole testare.
- 3) Dispensare 100 µl di antibiotico appena preparato sulla prima colonna. Eseguire una diluzione scalare 1:2 dell'antibiotico prelevando 50 µl dalla prima colonna e mettendoli nella seconda colonna, dalla seconda alla terza, così fino ad arrivare alla penultima colonna, qui prelevare 50 µl e buttarli.
- 4) Preparazione dell'inoculo batterico: tramite tampone sterile prelevare qualche colonia batterica e stemperare in 2ml di CAMHB. Misurare la densità ottica del campione alla lunghezza d'onda appropriata per il brodo utilizzato (625 nm). L'inoculo per essere standardizzato deve avere una densità ottica di 0,1 (0,08-0,12).

Diluire ulteriormente l'inoculo 1:100 prelevando 50 µl della sospensione a densità ottica 0,1 e mettendoli in una provetta contenente 5ml di CAMHB.

Aggiungere 50 µl dell'inoculo così diluito in tutti i pozzetti, in modo da ottenere una concentrazione finale di 5×10^5 UFC/ml.

- 5) Incubare la microtiter in termostato a 37°C e leggere i risultati dopo 18-24 ore.

L'interpretazione dei risultati ottenuti (Tabella 4) è stata eseguita secondo i valori di *breakpoint* forniti dal comitato EUCAST (EUCAST, 2021).

ANTIBIOTICO	MIC (µg/ml)	
	S ≤	R >
Aztreonam	1	4
Cefepime	1	4
Ciprofloxacina	0,25	0,5
Cloramfenicolo	8	8
Colistina	2	2
Ertapenem	0.5	0.5
Gentamicina	2	2
Imipenem	2	4
Meropenem	2	8
Amikacina (AK)	≤ 8	> 8

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

2.3 Estrazione DNA genomico

L'estrazione del DNA è una tecnica finalizzata alla raccolta e alla purificazione di DNA, che verrà successivamente impiegato in varie tecniche molecolari.

La prima fase è quella di lisi cellulare mediante enzimi in grado di rompere la parete e la membrana cellulare. Per rompere la parete si utilizza il lisozima che catalizza l'idrolisi del legame beta 1,4 tra NAM e NAG; possono essere usati anche alcuni detergenti per rompere le membrane (SDS, tween-20).

La seconda fase è la deproteinizzazione e purificazione del lisato: dopo la rottura della membrana plasmatica si ottiene una miscela complessa costituita da vari componenti cellulari (DNA, RNA, lipidi, carboidrati e proteine). È fondamentale la rimozione delle proteine dal lisato cellulare in quanto la cellula contiene:

- sia diversi enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici
- sia proteine che legandosi agli acidi stessi possono interferire con le reazioni successive.

La rimozione delle proteine avviene attraverso enzimi proteolitici, soprattutto le proteinasi K. Per ottenere il DNA in forma pura si utilizzano le RNAsi per eliminare l'RNA.

La terza fase è la raccolta e recupero dell'acido nucleico: avviene per affinità, ovvero viene sfruttata la tendenza dei frammenti di DNA e RNA ad adsorbirsi a particolari sostanze, nel nostro caso gel di silice, in presenza di alte concentrazioni di Sali caotropici. Una volta adsorbiti si esegue serie di lavaggi per eliminare tutto ciò che non si è legato e poi avviene l'eluizione degli acidi nucleici. L'eluizione si ottiene variando la forza ionica ed il pH della soluzione utilizzando acqua distillata o un tampone a bassa concentrazione salina (TE buffer, Tris 10 mM, EDTA, 1 mM).

Il DNA totale dei ceppi in esame è stato ottenuto mediante il sistema di estrazione e purificazione GenElute Bacterial Genomic DNA Kits (SIGMA-ALDRICH St Louis, MO), rispettando il seguente protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Protocollo:

- 1) Preparare una sospensione batterica del ceppo in esame, stemperando una discreta quantità di batteri prelevati da una coltura pura fresca in 1.5 ml di soluzione fisiologica.
- 2) Centrifugare per 2 minuti a 12.000-16.000 x g ed eliminare il sopranatante.
- 3) Risospendere il pellet con 180 µl di Lysis Solution T (Buffer STL per GenElute Mammalian Genomic DNA Kit).

- 4) Aggiungere 20 μ l di RNasi A Solution, mescolare e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.
- 5) Aggiungere 20 μ l di una soluzione di Proteinasi K (ad una concentrazione di 20.000 μ g/ml), mescolare e incubare per 30 minuti a 55°C.
- 6) Aggiungere 200 μ l di Lysis Solution C, vortexare per circa 15 secondi e incubare per 10 minuti a 55°C.
- 7) Inserire la colonnina fornita dal kit in una eppendorf da 2 ml, aggiungere 500 μ l di Column Preparation Solution, centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluito.
- 8) Aggiungere 200 μ l di etanolo assoluto al lisato e vortexare per 5-10 secondi.
- 9) Trasferire l'intero lisato nella colonnina preparata precedentemente, centrifugare a 12000 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluito.
- 10) Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf, aggiungere 500 μ l di Wash Solution 1, centrifugare a 12000 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluito.
- 11) Aggiungere 500 μ l di Wash Solution Concentrate, centrifugare alla massima velocità (12.000-16.000 x g) per 3 minuti ed eliminare l'eluito.
- 12) Centrifugare nuovamente la colonnina per 1 minuto alla massima velocità.
- 13) Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf e aggiungere 200 μ l di Elution Solution; incubare per 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 12000 x g per 1 minuto.
- 14) Conservare l'eluito finale (ca. 200 μ l), contenente il DNA genomico purificato, a -20°C.

2.4 Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR è una tecnica che consente l'amplificazione *in vitro* di un tratto definito di DNA del quale si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza complementare a quella del DNA di interesse (target) grazie all'enzima DNA polimerasi.

La tecnica qualitativa classica è definita *end-point*. Prevede la preparazione di un MIX di reazione costituito da:

- DNA target: segmento di DNA che si desidera riprodurre
- dNTP: nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti. Per ogni reazione è necessario usare una concentrazione di desossinucleotidi trifosfato di 200 μ M (dNTP). La concentrazione delle quattro basi azotate deve essere uguale per prevenire errori di incorporazioni o

artefatti, inoltre devono essere in grande eccesso rispetto al DNA stampo in modo da mantenere il loro rapporto costante anche negli ultimi cicli.

- PRIMER: sono opportuni "inneschi", costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre
- Taq DNA polimerasi: DNA polimerasi stabile che non viene denaturata se portata a 95°C. Oltre ad attività polimerasica ha anche attività endonucleasica.
- Tamponi/Buffer: che contengono vari ioni come sodio e potassio, necessari per costituire l'ambiente adatto alla reazione. Gli enzimi DNA polimerasi termostabili in particolare richiedono la presenza di magnesio (Mg^{2+}) come cofattore durante il processo di reazione.
- Acqua per portare a volume la reazione

In ogni PCR oltre ai campioni vengono caricati anche due controlli (positivo e negativo) per verificare la corretta esecuzione della procedura.

La reazione necessita di essere effettuata all'interno di un termociclatore, strumento che permette una rapida variazione di temperatura attraverso cicli continui.

Ogni ciclo di PCR prevede tre fasi:

- 1) Denaturazione (94-95°C; 3-5 minuti): la miscela di reazione viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99 °C in modo tale da poter denaturare il DNA e ottenere dei singoli filamenti liberi. La DNA polimerasi è in grado di copiare il DNA solo se questo è a singolo filamento.
- 2) Annealing (30 s - 1 minuto): appaiamento dei primers alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari. La temperatura di annealing (T_{ann}) non è fissa, ma varia in funzione della composizione dei primers utilizzati e della temperatura di Melting (T_m), ossia la temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA si trova in forma di doppia elica stabile ed il restante 50% in forma di singola elica. Nel caso in cui i due primers abbiamo temperature di Melting diverse, di solito si considera la T_m più bassa. Generalmente la T_{ann} è di circa $T_m - 2^\circ C$.
- 3) Estensione (72°C): allungamento dei primers mediante aggiunta di nucleotidi da parte della DNA polimerasi. Per definizione la Taq polimerasi produce un filamento complementare di DNA di 1 kb/minuto; perciò, il tempo di allungamento viene stabilito sulla base della dimensione dell'amplificato.

Il numero di cicli dipende dalla quantità di DNA iniziale da analizzare, in genere sono sufficienti 30-35 cicli.

Per quanto riguarda la cinetica di reazione, si ha una prima fase di crescita esponenziale caratterizzata dal raddoppiamento del prodotto accumulato dopo ogni ciclo (efficienza del 100%, dato che si parte da una condizione vantaggiosa in cui si ha poco DNA e tanti reagenti a disposizione), una seconda fase lineare in cui l'efficienza comincia gradualmente a diminuire e un'ultima fase di plateau, a livello della quale l'amplificazione si arresta e non dà più luogo a prodotti di reazione.

2.4.1 Applicazione di PCR e PCR multiplex per la ricerca di geni *bla*

Per questa tesi la PCR è stata applicata per la ricerca dei geni *bla*, nei ceppi batterici in esame (tabella 5).

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

Tabella 5. Geni *bla* ricercati tramite PCR, suddivisi nelle classi di Ambler di appartenenza.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nelle condizioni di tempo e temperatura riportate nella letteratura di riferimento (Dallenne 2010, Poirel et al.2011, Pagani 2003 e Meunier JAC_2017), utilizzando i primer illustrati nella tabella 6 successiva e la Dream Taq della ditta Thermo Fisher Scientific. L'elenco completo dei componenti utilizzati, delle rispettive concentrazioni e volumi finali è riportato in seguito:

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME FINALE
DNA genomico	non standardizzata	2 µl
Buffer 10X	1X	5 µl
Primers	<i>vedi letteratura di riferimento</i>	<i>dipende dalla concentrazione richiesta in letteratura</i>
dNTP	200 µM	1 µl
Dream Taq	1 U	0,2 µl
H ₂ O MilliQ sterile e DNasi free		Fino ad arrivare a 50 µl

Gene bla	Primer	Sequenza 5' – 3'	Dimensione (bp)	Bibliografia	
TEM	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	Dallenne 2010	
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
SHV	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713		
	MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
OXA-1	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564		
	MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG			
CTX-M	CTX MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593		Pagani 2003
	CTX MU2	TGGGTAAARTARGTSACCAGA			
GES	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399		Dallenne 2010
	MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT			
VEB	MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648		
	MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG			
PER	MultiPER_for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520		
	MultiPER_rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA			
VIM	VIM F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	Poirel et al. 2011	
	VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG			
IMP	IMP F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232		
	IMP R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
NDM	NDM F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621		Poirel et al. 2011
	NDM R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
OXA-48	OXA F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438		
	OXA R	CATCAAGTTCAACCAACCG			
KPC	KPC Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798		
	KPC Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	232		
SME	SME-F	AACGGCTTCATTTTTGTTTAG	831	Meunier JAC_2017	
	SME-R	GCTTCCGCAATAGTTTTATCA			
ACC	MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346	Dallenne 2010	
	MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC			
FOX	MultiCaseFOX_for	CTACAGTGC GG TGGTTT	162		
	MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGCCAGGTGA			
MOX/ CMY	MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	895		
	MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA			
DHA	MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997		
	MultiCaseDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG			
	MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538		

LAT/ BIL/ CMY	MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY	
ACT-1/ MIR-1	MultiCaseEBC_for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683
	MultiCaseEBC_rev	AGCCTAACCCCTGATACA	

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

2.5 Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel è una tecnica che consente di separare le molecole di acido nucleico mediante l'applicazione di un campo elettrico generato da due elettrodi.

Essendo carico negativamente, il DNA tende a migrare verso l'anodo (polo positivo), più o meno rapidamente in base alle sue dimensioni; le molecole più piccole risultano avere una mobilità elettroforetica maggiore, dal momento che vengono frenate meno dal setaccio molecolare creato dal gel di agarosio rispetto alle molecole più grandi.

Le sostanze utilizzate per eseguire la corsa elettroforetica sono state:

- Green Gel (Società Italiana Chimici): molecola fluorescente intercalante del DNA per la visualizzazione delle bande di amplificazione mediante transilluminazione UV.
- TriTrack DNA Loading dye (6X) (Thermo Fisher Scientific): miscela che consente di seguire visivamente l'elettroforesi dei campioni, inoltre facilita la deposizione del campione di DNA sul fondo del pozzetto di carica.
- Marker (100 bp Plus): marcatore molecolare costituito da frammenti di DNA di peso molecolare noto utile per monitorare la qualità della corsa elettroforetica e per stimare la dimensione molecolare degli amplificati (range, 100-3000 bp).

Procedura:

- 1) Preparare il gel (1 o2 %) aggiungendo 1 o2 g di agarosio (Agarose D-1 LE, Standard for Molecular Biology - Fisher Molecular Biology) a 100 ml del tampone per la corsa elettroforetica TAE 1X.
- 2) Aggiungere 300 µl di Green Gel e lasciare solidificare il gel in apposito sistema dotato di pettine per la formazione dei pozzetti.
- 3) Posizionare il gel nella vaschetta di elettroforesi contenente TAE 1X e caricare i campioni mescolando 10 µl di DNA amplificato a 2 µl di Loading Dye.

- 4) Caricare 5 µl di marker 100 bp plus (range, 100-3000 bp) e attivare il sistema applicando un voltaggio costante di 80 V.
- 5) Dopo circa 30-40 minuti di corsa elettroforetica visualizzare le bande di DNA mediante trans-illuminatore UV.

2.6 PFGE – elettroforesi a gel in campo pulsato

La Pulsed Field Gel Electrophoresis è una tecnica che permette la separazione di frammenti di DNA fino a circa 50 mila basi. Avviene in un gel di agarosio a cui è applicato un campo elettrico la cui direzione viene cambiata periodicamente secondo i valori di: switch time, field angle e ramping factor. È stata eseguita la procedura operativa standard del CDC (“Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*”).

Materiali:

- TE buffer

10mM di Tris

1mM di EDTA pH8

Acqua sterile ultrapura

- Cell suspension Buffer

100mM di Tris

100mM di EDTA pH 8

Acqua sterile ultrapura

- Cell Lysis buffer

50mM di Tris

50mM di EDTA (pH 8)

1% Sarcosyl

- Gel di Agarosio

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

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

- TBE 0,5X

Procedura:

- 1) Mescolare le colture O/N dei ceppi batterici esaminati con pari volume di low-melting-point agarose all'1,6% (Bio-Rad, Hercules, California, USA) e introdurre in appositi stampi "plug-mold" per formare le plug.
- 2) Una volta solidificate, incubarle per 24 h a 54°C in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1 mg/ml) e proteinasi K (20 µg/ml). Successivamente, per eliminare i residui di proteine, lisozima e proteinasi K dalle plugs fare dei lavaggi: tre in acqua e tre in TE buffer, tutti a 54°C in agitazione.
- 3) A questo punto avviene la digestione. Prelevare circa metà plug e metterla in una eppendorf con 40U di XbaI (Sigma-Aldrich) a 37°C per 1 ora e mezza. Bloccare la digestione trasferendo le plug in 1ml di EDTA 0.5M. L'enzima XbaI riconosce e taglia la sequenza 5'-T↓CTAGA-3' 3'-AGATC ↑ T-5'.
- 4) Far aderire ogni plug e un'aliquota del marker, che contiene frammenti di DNA da 50 a 1000kb (ProMega-Markers Lambda Ladders, USA), in un segmento del "pettine supporto".
- 5) Porre il pettine con i campioni nella vaschetta e versare il Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) all'1% in TBE 0,5 X.
- 6) Impostare lo strumento CHEF MAPPER XA SYSTEM (Bio-Rad) (Figura.2) con le seguenti condizioni di elettroforesi: voltaggio 6V/cm per 22 h a 14°C, con angolo incluso di 120°; initial switch time di 2,2 s, final switch time di 54,2 s, ramping factor lineare.

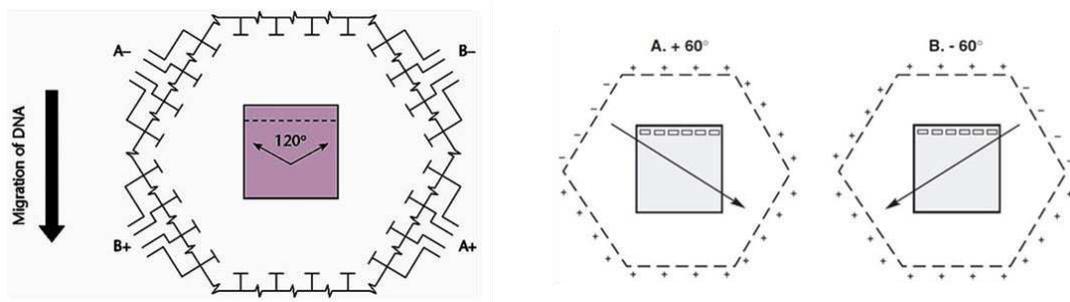


Figura 2. Esempio di sistema CHEF per PFGE

- 7) A corsa ultimata mantenere il gel in immersione per almeno 30 minuti in una soluzione con Bromuro di Etidio (0,5 µg/ml) ed infine acquisire l'immagine al transilluminatore UV.

Per l'interpretazione dell'esperimento e poter confrontare il profilo di bande ottenuto, sono stati utilizzati i criteri interpretativi standard secondo quanto riportato nella seguente tabella (7) (Tenover FC, 1995).

Categoria	N. di frammenti differenti
Indistinguibili	0
Strettamente correlati	2-3
Possibilmente correlati	4-6
Differenti	≥ 7

Tabella 7. Criteri interpretativi standard della PFGE.

3. RISULTATI

I 16 ceppi appartenenti all'ordine *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi, non produttori di carbapenemasi, precedentemente isolati da campioni fecali sono stati analizzati dividendoli in due gruppi, riportati in Tabella 8.

Gruppo <i>E.coli</i>		Gruppo <i>Enterobacterales</i> (non <i>E. coli</i> , non ECC)	
506959	<i>Ec</i>	516693	<i>C. freundii</i>
52828	<i>Ec</i>	77169	<i>S. marcescens</i>
517735-2	<i>Ec</i>	527838	<i>P. mirabilis</i>
510688	<i>Ec</i>	530175	<i>P. mirabilis</i>
521756	<i>Ec</i>	523300	<i>M. morgani</i>
525328	<i>Ec</i>	528023	<i>M. morgani</i>
528046	<i>Ec</i>	530071	<i>M. morgani</i>
527640	<i>Ec</i>	37377	<i>H. alvei</i>

Tabella 8. Tabella dei ceppi analizzati suddivisi per gruppi.

3.1 PROFILO DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI (RESISTOTIPO)

Tutti i 16 ceppi sono stati valutati per la loro sensibilità agli antibiotici, sia con il metodo di diffusione in agar che con quello di diluizione in brodo.

In Tabella 9 è riportato il resistotipo del gruppo *E.coli*, in tabella 10 quello del gruppo che include le altre specie *Enterobacterales* (non *E. coli* e non ECC).

Entrambe le tabelle sono state ottenute combinando i risultati ottenuti con le due procedure di riferimento di diffusione in agar e di microdiluizione in brodo per determinare la minima concentrazione inibente (MIC).

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Antibiotici β-LATTAMICI								Altri antibiotici non β- lattamici						
		A U G	C A Z	C T X	F E P	A T M	I P M	M E R	E T P	C I P	S X T	C H L	G E N	A K	C O L	F O S
<i>E.coli</i>	506959	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	52828	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	517735-2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	510688	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	521756	R	R	R	NS	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	525328	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i>	528046	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S
<i>E.coli</i>	527640	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabella 9. Resistotipo del gruppo *E.coli*

Dal punto di vista del resistotipo il gruppo *E. coli* si dimostra molto omogeneo. Il 50% dei ceppi sono resistenti all'ertapenem (MIC range, 1 – 4 µg/ml) mentre risultano tutti sensibili agli altri carbapenemi testati (imipenem e meropenem). I ceppi resistenti ad ertapenem risultano essere resistenti anche a tutti i β-lattamici testati, appartenenti alle categorie delle Penicilline, Cefalosporine e Monobattamici. Rispetto agli antibiotici non β-lattamici le resistenze sono variabili: 3 ceppi sono resistenti alla ciprofloxacina (CIP) e 3 al trimetoprim-sulfametoxazolo (SXT), 1 solo ceppo era resistente al cloramfenicolo (CHL) e alla gentamicina (GEN). Nessun ceppo resistente è stato individuato per gli antibiotici amikacina (AK), colistina (COL) e fosfomicina (FOS).

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Antibiotici β-LATTAMICI								Altri antibiotici non β-lattamici						
		A U G	C A Z	C T X	F E P	A T M	I P M	M E R	E T P	C I P	S X T	C H L	G E N	A K	C O L	F O S
<i>C. freundii</i>	516693	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. marcescens</i>	77169	R	NS	S	S	S	R	NS	R	S	S	S	R	R	R	R
<i>P. mirabilis</i>	527838	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>P. mirabilis</i>	530175	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>M. morgani</i>	523300	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>M. morgani</i>	528023	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R
<i>M. morgani</i>	530071	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>H. alvei</i>	37377	R	R	R	NS	R	S	NS	R	S	S	S	S	S	S	R

Tabella 10. Resistotipo gruppo che include le altre specie *Enterobacterales* (non *E. coli* e non *ECC*)

Considerando il gruppo restante, tutti i ceppi sono classificabili come CRE vale a dire resistenti o non sensibili ad almeno 1 carbapenemico. Nel complesso la resistenza ai carbapenemi è ampiamente variabile e tiene conto delle caratteristiche microbiologiche di resistenza intrinseca delle diverse specie. Per esempio, le specie *Serratia*, *Proteus* e *Morganella*, in virtù dell'appartenenza alla tribù *Proteae*, sono intrinsecamente non suscettibili ad imipenem (IPM). Tuttavia, i ceppi 523300 (*M. morgani*) e 77169 (*S. marcescens*) dimostrano una non sensibilità o resistenza ad almeno un'altra molecola carbapenemica.

A parte l'imipenem, i due ceppi di *P. mirabilis* risultano sensibili a tutti gli altri antibiotici beta-lattamici, mentre sono variamente resistenti a tutte le altre classi di antibiotici eccetto CHL.

Anche riguardo l'antibiotico colistina (COL) la resistenza riscontrata in tutti i ceppi eccetto 1 (*C. freundii* 516693) è dovuta ad una insensibilità costitutiva della tribù *Proteae* e della specie *Hafnia alvei*.

Più interessante è il resistotipo dell'unico ceppo isolato di *C. freundii*. In questo caso il ceppo è resistente, sebbene a basso livello, solo ad ertapenem (ETP) (MIC, 1 µg/ml) ed a tutti gli altri beta-lattamici eccetto il cefepime (FEP), una cefalosporina di quarta generazione, stabile all'azione delle beta-lattamasi che idrolizzano le cefalosporine di III generazione come quelle studiate CAZ e CTX. L'analisi complessiva del resistotipo suggeriva la produzione di una beta-lattamasi di classe C.

3.2 ANALISI DEL RESISTOMA (geni di beta-lattamasi)

I geni che codificano per le beta-lattamasi sono stati ricercati tramite tecniche di amplificazione genica (PCR e Multiplex PCR) utilizzando primer di letteratura (Poirel, 2011, Dallene, 2010, Meunier JAC_2017). I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 11 e 12 sottostanti, divisi per gruppi di lavoro. Per tutti i ceppi è stata confermata l'assenza di geni *bla* per la produzione delle 5 famiglie di carbapenemasi più diffuse (KPC – OXA-48 – VIM – IMP – NDM).

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Geni <i>bla</i> individuati (classe Ambler)			
		A	B	C	D
<i>E. coli</i>	506959	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	52828	TEM, CTX-M	-	-	-
<i>E. coli</i>	517735-2	TEM	-	-	-
<i>E. coli</i>	510688	TEM, CTX-M	-	-	-
<i>E. coli</i>	521756	-	-	CMY	-
<i>E. coli</i>	525328	TEM	-	-	-
<i>E. coli</i>	528046	CTX-M	-	-	OXA-1
<i>E. coli</i>	527640	-	-	-	-

Tabella 11. Geni *bla* suddivisi per classe di Ambler individuati nel gruppo di *E. coli*.

La maggior parte dei ceppi di *E. coli* hanno dimostrato di avere geni *bla* appartenenti alla classe A di Ambler. In particolare, 4 ceppi presentano il gene *bla*TEM e 3 ceppi il gene *bla*CTX-M. Sono stati identificati anche un gene di classe C, *bla*CMY, nel ceppo 521756 e un gene appartenente alla classe D, *bla*OXA-1, nel ceppo 528046. Quest'ultimo, inoltre, è l'unico ceppo di *E. coli* positivo per due geni di beta-lattamasi: *bla*CTX-M e *bla*OXA-1.

Nella foto in Figura 3 è visualizzato il risultato della procedura di PCR-multiplex per la ricerca dei geni *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*OXA in alcuni ceppi.

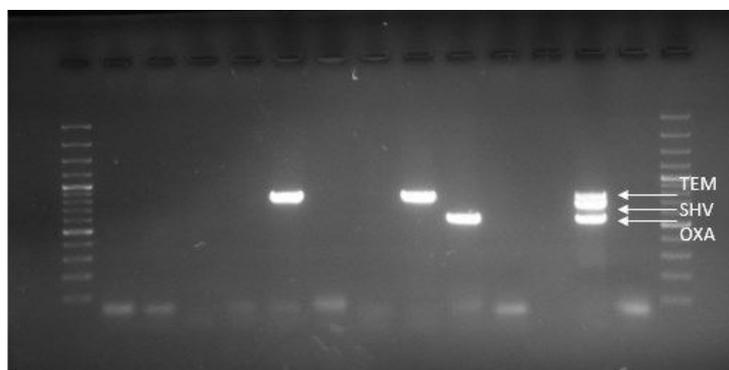


Figura 3. Identificazione dei geni *bla*TEM e *bla*OXA tramite PCR-multiplex e separazione elettroforetica su gel di agarosio (Dallene 2010).

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Geni <i>bla</i> individuati (classi di Ambler)			
		A	B	C	D
<i>Citrobacter freundii</i>	516693	-	-	CMY	-
<i>Serratia marcescens</i>	77169	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	527838	TEM	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	530175	TEM	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	523300	-	-	DHA	-
<i>Morganella morganii</i>	528023	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	530071	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	37377	-	-	ACC	-

Tabella 12. Geni *bla* suddivisi per classe di Ambler individuati nel gruppo che include le altre specie *Enterobacterales* (non *E. coli* e non *ECC*)

S. marcescens 77169 e due ceppi di *M. morganii* (528023 e 530071) hanno mostrato di non possedere alcun gene di quelli ricercati; mentre l'altro ceppo di *M. morganii* (523300) risulta positivo per il gene *bla*DHA, che codifica per una beta-lattamasi appartenente alla classe C di Ambler.

Entrambi gli isolati di *P. mirabilis* erano positivi per la presenza del gene *bla*TEM (classe A di Ambler).

Un solo ceppo (*H. alvei* 37377) era positivo per il gene *bla*ACC; ACC-2 è una beta-lattamasi a trasmissione plasmidica trovata in *Hafnia alvei* (Girlich, 2000).

Interessante è la positività a *bla*CMY, riscontrata in *C. freundii* 516693. Difatti questo gene, per lo più a collocazione plasmidica, è molto diffuso tra gli enterobatteri; inoltre, la sua espressione è associata con la resistenza a molti beta-lattamici ed alla ridotta suscettibilità ad ertapenem. La presenza di tale gene può giustificare il fenotipo di resistenza osservato in questo ceppo. Una considerazione simile può essere riferita anche al ceppo di *E. coli* 521756 che risulta resistente a ertapenem (MIC 4 µg/ml), AUG, CAZ, CTX, ATM e non sensibile a FEP. In tutte le resistenze di questo ceppo, oltre a possibili modificazioni/eliminazioni di porine, è sicuramente coinvolto anche il gene *bla*CMY che è stato individuato tramite PCR.

3.3 Tipizzazione genomica mediante XbaI-PFGE

Il grado di correlazione genetica dei 16 ceppi in esame è stato studiato mediante la tecnica di PFGE, previa restrizione con l'enzima XbaI (Tabelle 13 e 14).

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Pulsotipo (XbaI-PFGE)
<i>E. coli</i>	506959	C
<i>E. coli</i>	52828	A
<i>E. coli</i>	517735-2	B
<i>E. coli</i>	510688	A
<i>E. coli</i>	521756	D
<i>E. coli</i>	525328	B
<i>E. coli</i>	528046	E

Tabella 13. Risultati tipizzazione genotipica con XbaI-PFGE del gruppo di *E. coli*

Tra i ceppi di *E. coli* sono state identificate due coppie di ceppi identici. Il ceppo 52828 è geneticamente identico al ceppo 510688, entrambi indicati con pulsotipo A. Il ceppo 517735-2 è geneticamente identico al ceppo 525328, entrambi indicati con pulsotipo B. Gli altri 3 isolati di *E. coli* (506959, 521756, 528046) risultano essere geneticamente unici e non correlati, tutti presentano quindi un diverso pulsotipo.

Specie (ID)	Ceppi (N°)	Pulsotipo (XbaI-PFGE)
<i>C. freundii</i>	516693	Singleton
<i>S. marcescens</i>	77169	Singleton
<i>P. mirabilis</i>	527838	P
<i>P. mirabilis</i>	530175	P
<i>M. morgani</i>	523300	NT
<i>M. morgani</i>	528023	MM-A
<i>M. morgani</i>	530071	MM-B
<i>H. alvei</i>	37377	Singleton

Tabella 14. Risultati tipizzazione genotipica con XbaI-PFGE del gruppo che include le altre specie *Enterobacteriales* (non *E. coli* e non *ECC*).

2 dei 3 ceppi di *Morganella* sono geneticamente distinti (profili di restrizione non correlati) e l'ultimo risulta non tipizzabile con l'endonucleasi XbaI come si può notare in Figura 4. I 2 ceppi di *P. mirabilis* presentano sono geneticamente identici avendo lo stesso profilo di restrizione (pulsotipo P). Per quanto riguarda invece le singole specie *C. freundii*, *S. marcescens* e *H. alvei*, ciascun campione ha un profilo di restrizione unico (indicato come *singleton* in Tabella 14). I vari profili di restrizione trovati, con le eventuali omologie, sono rappresentati in Figura 4.

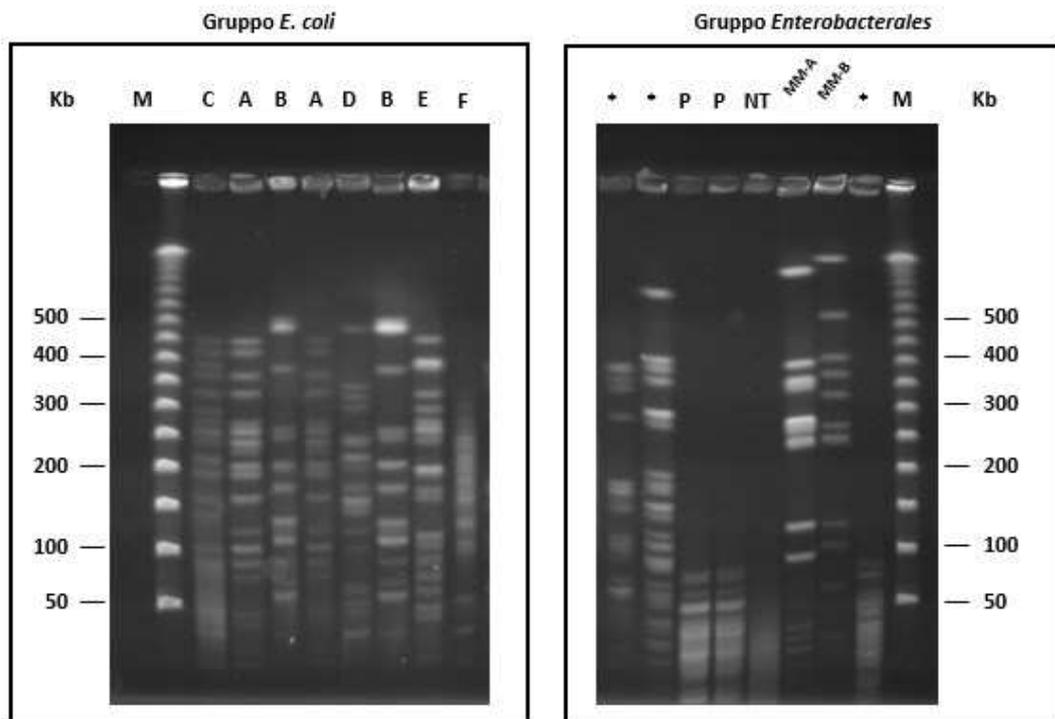


Figura 4. Elettroforesi in campo pulsato raffigurante i profili di restrizione XbaI dei ceppi analizzati divisi nei due gruppi di lavoro. I ceppi sono indicati con il proprio pulsotipo. Con * sono stati indicati i ceppi *singleton* ossia con profilo di restrizione unico.

4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Senza strategie politiche armonizzate e condivise a livello mondiale per contrastare la resistenza antimicrobica, il numero già importante di decessi (700.000 morti/anno) che si registra attualmente, potrebbe raggiungere la cifra di 10 milioni/anno entro il 2050. Oltre ai tragici costi umani, l'AMR ha anche un reale impatto economico, con una perdita stimata di 100 trilioni di dollari da qui al 2050, se il fenomeno non verrà affrontato adeguatamente (O'Neill, 2016).

Tra le specie resistenti ai carbapenemi particolare attenzione va posta a quelle appartenenti all'ordine *Enterobacterales* in quanto sono spesso multiresistenti (MDR), producono una varietà di beta-lattamasi, comprese quelle a spettro esteso (ESBL) e sono responsabili di gravi infezioni nosocomiali; tali isolati rappresentano una crescente minaccia globale (Bassetti M. e al, 2016).

Per questo studio sono stati presi in considerazione 16 isolati appartenenti all'ordine *Enterobacterales* tutti presentanti resistenza nei confronti di almeno un carbapeneme ma non produttori di carbapenemasi.

È stata valutata la sensibilità alle principali classi di antibiotici utilizzabili a scopo terapeutico per *Enterobacterales* quali: β -lattamici, aminoglicosidi, fluorochinoloni, inibitori del folato, polimixine e fenicoli. Tra i β -lattamici in particolare sono state analizzate le cefalosporine di III (ceftazidime e cefotaxime) e IV generazione (cefepime), i monobattamici (aztreonam) e i carbapenemi imipenem, meropenem ed ertapenem. Il profilo di resistenza (resistotipo) di tutti i ceppi è stato ottenuto applicando le procedure standardizzate di diffusione in agar e di microdiluzione in brodo ed i criteri di interpretazione (*breakpoint*) di EUCAST (EUCAST, 2021). Considerando i risultati complessivi il 50% (8 ceppi) è resistente all'ertapenem, il 37,5% (6 ceppi) è resistente ad imipenem ed infine nessun ceppo è resistente a meropenem (2 ceppi mostrano una non sensibilità). Solo 1 isolato (*H. alvei* 37377) mostrava non suscettibilità/resistenza a tutti i tre carbapenemi. Viceversa, il 25% dei ceppi (n. 4 ceppi, tutti *E. coli*) risultano sensibili a tutti i carbapenemi.

La resistenza di questi ceppi a uno o più carbapenemi è presumibilmente associata a meccanismi di modificazione o perdita di porine in combinazione con la produzione di altre β -lattamasi, in quanto non sono produttori di carbapenemasi. Successivamente, quindi, è stata fatta un'analisi genotipica per ricercare i geni *bla* codificanti per altre beta-lattamasi, utilizzando sia metodiche di PCR con singole coppie di primer, sia di PCR-multiplex. Il gene *bla* più riscontrato è stato *bla*TEM nel 37,5% dei ceppi (6), nel 18,75% (3) è stato ritrovato il gene *bla*CTX-M, nel 12,5% dei ceppi (2) *bla*CMY. Singolarmente sono stati ritrovati anche, *bla*OXA-1, *bla*ACC, *bla*DHA.

È ragionevole credere che la resistenza ai carbapenemi, nei ceppi in cui sono stati trovati i sopra citati geni *bla* di beta-lattamasi, sia dovuta proprio alla produzione e codificazione di tali geni. Per i ceppi in cui non è stato trovato nessun gene la resistenza a uno o più carbapenemi potrebbe essere data da altri geni non ricercati in questo studio, o da meccanismi di modificazione/perdita delle purine o anche da una iperproduzione di AmpC. Gli AmpC codificati da plasmidi sono liberamente trasferibile tra le specie, con conseguente aumento della resistenza a più classi di beta-lattamici compresi i carbapenemi (Bush, 2018).

A completamento delle indagini genotipiche, è stata condotta la tipizzazione genomica mediante XbaI-PFGE. L'analisi dei profili ottenuti e l'interpretazione dei risultati è stata eseguita mediante criteri di letteratura (Tenover 1995). Dei 16 ceppi sottoposti a PFGE sono state trovate tre coppie di cloni, il resto erano profili singoli. Solo un campione è risultato non tipizzabile. Per quanto riguarda il gruppo di *E.coli*, su 8 ceppi sono stati trovati 6 genotipi diversi. Questo significa che due coppie di genomi erano indistinguibili, ma guardando complessivamente il quadro della situazione il confronto dei genomi ci indica che sono poco correlati tra di loro.

Mentre nell'altro gruppo abbiamo osservato la presenza di una sola coppia di cloni appartenenti ai ceppi *P. mirabilis* che mostravano identico pulstotipo. I restanti ceppi mostravano tutti un profilo di restrizione differente, persino i 3 ceppi di *M. morganii* non mostravano nessuna correlazione genetica tra di loro.

4.1 Conclusioni

Per questo studio sono stati analizzati ceppi batterici raccolti da un precedente screening, effettuato nel 2018 presso la sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, su campioni fecali umani provenienti dall'Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti" di Ancona.

Nonostante lo studio sia stato condotto su un numero relativamente piccolo di campioni, ciò che ne risulta sono 12 su 16 ceppi CRE colonizzanti l'intestino che mostrano una grande diversità genotipica. Provenendo tutti dallo stesso bacino di utenza, si evidenzia una differente distribuzione tra i ceppi comunitari e quelli che vengono isolati da campioni clinici umani. Solitamente gli *Enterobatteri* che vengono identificati risultano molto più simili filogeneticamente, in particolare, la specie *K. pneumoniae* KPC-produttore è caratterizzata dalla sua clonalità, soprattutto in ambito nosocomiale, in quando la maggior parte dei ceppi circolanti globalmente appartengono al complesso clonale "CC258" (Iovleva, 2017).

Partendo dal lavoro fatto, in futuro, è auspicabile ampliare le conoscenze sulla distribuzione e sull'evoluzione dei ceppi MDR comunitari, per poter approfondire i meccanismi molecolari e le cause alla base della resistenza ai carbapenemi.

5. BIBLIOGRAFIA

- **Ambler RP.** 1980. “The structure of beta-lactamases”. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 289: 321–331
- **Bassetti Matteo,** Maddalena Peghin, Davide Pecori. *The management of multidrug-resistant Enterobacteriaceae.* 2016 Dec;29(6):583-594. doi: 10.1097/QCO.0000000000000314.
- **Bush K.** 2018. “Past and Present Perspectives on β -Lactamases”. *Antimicrob Agents Chemother.* Set; 62 (10). pii: e01076-18. DOI: 10.1128 / AAC.01076-18.
- **CLSI, 2015:** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Wayne, PA. 2015. *Verification of Commercial Microbial Identification 38 and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems.* 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute
- **Dallenne C, Da Costa A, Decré D et al.** 2010. “Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae”. *J Antimicrob Chemother.* Mar; 65 (3): 490-495. DOI: 10.1093 / jac / dkp498.
- **ECDC, 2019.** Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae-Second update Event Background Current Situation of CRE in EU/EEA Countries.
- **Girlich D, et al.** 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1470-1478. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*.
- **Iacchini S, D’Ancona F, Bizzotti V, Giannitelli S, Monaco M, Errico G, Bellino S, Pezzotti P, Pantosti A, Iannazzo S.** CPE: sorveglianza nazionale delle batteriemie da enterobatteri produttori di carbapenemasi. Dati 2019. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISS Sorveglianza RIS-2/2020).
- **Iovleva A, Doi Y.** 2017. “Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae”. *Clin Lab Med.* Jun; 37(2): 303-315. DOI: 10.1016 / j.cll.2017.01.005.
- **Jacoby GA.** AmpC B-Lactamase. *Clinical Microbiology Reviews.* 2209;22(1);161-182. Doi:10.1128/CMR.00036-08.

- **Livermore David M.** “Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens”. 2012 Jun;27(2):128-42. doi: 10.3904/kjim.2012.27.2.128.
- **Meunier D, Findlai J, Doumith M, et al.** FRI-2 carbapenemase-producing-Enterobacter cloacae complex in the UK. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2017;72(9):2478-2482. doi:10.1093/jac/dkx173
- **Nordmann P, Poirel L.** 2014. “The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide”. 50 Clin Microbiol Infect. Set; 20 (9): 821-830. DOI: 10.1111 / 1469- 0691.12719.
- **O’Neill J. 2014.** “*Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*”. Review on Antimicrobial Resistance.
- **O’Neill J. 2016.** “*Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations*”. The review on Antimicrobial Resistance.
- **Pagani L, Dell’Amico E, Migliavacca R et al.** 2003. “Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy”. J Clin Microbiol. Set; 41 (9): 4264-4269. DOI: 10.1128 / jcm.41.9.4264-4269.2003.
- **Poirel L, Potron A, Nordmann P.** 2012. “OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace”. J Antimicrob Chemother. Lug; 67 (7): 1597–1606. DOI: 10.1093 / jac / dks121
- **Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P.** 2011. “Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes”. Diagn Microbiol Infect Dis. Mag; 70 (1): 119-123. DOI: 10.1016 / j.diagmicrobio.2010.12.002
- **Rus Maria, Monica Licker, Corina Musuroi, Edward Seclaman, Delia Muntean, Natalia Cirlea, Alina Tamas, Silvana Vulpie, Florin George Horhat, Luminita Baditoiu,** “*Distribution of NDM1 Carbapenemase-Producing Proteeae Strains on High-Risk Hospital Wards*”. 2020 Dec 31;13:4751-4761. doi: 10.2147/IDR.S280977.
- **Shahid, Mohammada; Sobia, Farrukha; Singh, Anuradhaa; Khan, Haris Ma; Hawkey, Peter Mb,c; Huq, Anward; Khardori, Nancye.** “AmpC β -lactamases and bacterial resistance: an updated mini review”. July 2009. doi: 10.1097/MRM.0b013e328331ad83

- **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. “Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing”. *Journal of clinical microbiology*. 33(9):2233-2239
- **Tzouvelekis LS, Bonomo RA.** 1999. “SHV-type β -lactamases”. *Curr Pharm Des*. Nov; 5 (11): 847-864
- **Walters MS, Witwer M, Lee Y, et al.** *Notes from the Field: Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Less Common Enterobacteriaceae Genera — United States, 2014–2017*. June, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67:668–669. DOI: [http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6723a4external icon](http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6723a4external%20icon)
- **World Health Organization (WHO).** 2015. “Global Action Plan on Antimicrobial Resistance”.
- **World Health Organization (WHO).** 2017. “Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics”
- **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al.** 2001. “Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*”. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr; 45 (4): 1151–1161. DOI: 10.1128 / AAC.45.4.1151-1161.2001
- **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009. “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”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(12): 5046-5054 DOI: 10.1128/AAC.00774-09.
- **Yoon Eun-Jeong and Seok Hoon Jeong¹ J.** Class D beta-lactamases. *Antimicrob Chemother* 2021; 76: 836–864 doi:10.1093/jac/dkaa513