

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1 Genere <i>Enterobacter</i>	2
1.1.1 <i>Enterobacter cloacae complex</i>	3
1.2 Meccanismi di resistenza ai carbapenemi	4
1.2.1 <i>Produzione di carbapenemasi</i>	5
1.2.2 <i>Espressione delle pompe di efflusso</i>	6
1.2.3 <i>Mutazioni delle porine</i>	7
1.3 Meccanismi di trasferimento genetico orizzontale	7
1.3.1 <i>Coniugazione</i>	9
1.4 Scopo della ricerca	12
2. MATERIALI E METODI	13
2.1 Ceppi batterici	13
2.2 Coniugazione	16
2.3 Analisi fenotipica dei transconiuganti	19
2.3.1 <i>Antibiogramma</i>	19
2.3.2 <i>Minima Concentrazione Inibente (MIC)</i>	19
2.3.3 <i>Test fenotipici per evidenziare l'attività carbapenemasi (mCIM)</i>	20
2.4 Analisi molecolare dei transconiuganti e procedure di tipizzazione	21
2.4.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	21
2.4.2 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis (RFLP-PFGE)</i>	22
3. RISULTATI	26
3.1 Risultati ottenuti dalle coniugazioni effettuate con i ceppi del gruppo 1	26
3.2 Risultati ottenuti dalle coniugazioni effettuate con i ceppi del gruppo 2	26
3.2.1 <i>Analisi dei transconiuganti</i>	30
3.2.2 <i>Sensibilità agli antibiotici e attività carbapenemasi</i>	30
3.2.3 <i>Saggi di amplificazione</i>	32
3.2.4 <i>Sequenziamento Nanopore MinION</i>	33
4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	35
4.1 Conclusioni	37
5. BIBLIOGRAFIA	39

1. INTRODUZIONE

1.1 Genere *Enterobacter*

Il genere *Enterobacter*, descritto per la prima volta nel 1960, comprende bacilli Gram-negativi anaerobi facoltativi, lunghi 2 μm , mobili per mezzo di flagelli peritrichi e appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Ad oggi, nel genere sono state identificate 22 specie: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* e *E. turicensis*.

I batteri del genere *Enterobacter* sono associati a una varietà di habitat ambientali, sono presenti nel suolo e nell'acqua e sono endofiti o considerati fitopatogeni per varie specie vegetali. Inoltre, rappresentano anche dei commensali naturali del microbiota intestinale animale e umano. Tra questi batteri, solo alcune specie/sottospecie sono associate ad infezioni ed epidemie acquisite in ospedale. Difatti, i ceppi *Enterobacter* spp. sono membri del gruppo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species) che comprende i principali agenti eziologici responsabili di infezioni nosocomiali difficili da trattare a causa dell'adattamento di queste specie agli agenti antimicrobici.

Diversi focolai ospedalieri sono stati segnalati in Europa dalla metà degli anni 90 e l'ampio uso di antibiotici ad ampio spettro ha stimolato la diffusione di cloni resistenti. Questi patogeni sono frequentemente associati ad un fenotipo di multiresistenza ai farmaci (MDR), principalmente a causa del loro adattamento all'ambiente ospedaliero e della loro capacità di acquisire elementi genetici mobili contenenti geni di resistenza e virulenza ¹.

Lo sviluppo e l'uso degli antibiotici a partire dalla seconda metà del 1900 ha portato un beneficio a livello mondiale, permettendo di trattare e/o prevenire le malattie causate da batteri, virus e parassiti emergenti; allo stesso tempo però ha causato la comparsa e l'incremento di antibiotico resistenze soprattutto in seguito all'uso inappropriato di farmaci a livello sia di medicina umana che veterinaria e alla maggior diffusione dei ceppi resistenti dovuta ad un aumento di viaggi e degli spostamenti internazionali.

Alla luce di questa situazione gli esperti hanno deciso di suddividere le varie specie di patogeni, in base ai loro meccanismi di resistenza, in tre gruppi di priorità: Critica, Alta e Media.

Priorità	
Critica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> , carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant
Alta	<i>Enterococcus faecium</i> , vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant <i>Helicobacter pylori</i> , clarithromycin-resistant <i>Campylobacter</i> , fluoroquinolone-resistant <i>Salmonella spp.</i> , fluoroquinolone-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicillin-non-susceptible <i>Haemophilus influenzae</i> , ampicillin-resistant <i>Shigella spp.</i> , fluoroquinolone-resistant

Tabella 1. Classi di priorità (WHO,2017) ²

Come si evince dalla Tabella 1 alle diverse classi di priorità appartengono varie specie ed i membri della famiglia *Enterobacteriaceae* sono inclusi nel gruppo a priorità CRITICA che comprende i ceppi resistenti alle cefalosporine di 3° generazione ed ai carbapenemi, antibiotici di ultima generazione usati nel trattamento di infezioni da patogeni multiresistenti.

1.1.1 *Enterobacter cloacae complex*

Tra le diverse specie note di *Enterobacter*, 7 sono incluse all'interno di un raggruppamento, indicato come *Enterobacter cloacae complex* (ECC): *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* e *E. nimipressuralis*. Le specie sono genotipicamente molto vicine e condividono oltre il 60% di omologia DNA-DNA. *E. cloacae* rappresenta la specie tipo ed insieme a *E. hormaechei* sono le specie più frequentemente isolate nei campioni clinici. La sopravvivenza in diversi serbatoi e la dimostrazione di ceppi ECC in diverse fonti facilitano la colonizzazione dei pazienti, unitamente alla resistenza intrinseca all'Ampicillina, all'Amoxicillina-Acido Clavulanico e alla Cefoxitina grazie alla produzione di una cefalosporinasi naturale inducibile. La regolazione dell'espressione dell'enzima AmpC (derepressione e produzione costitutiva

in seguito a mutazione) può portare alla resistenza a un gran numero di β -lattamici, comprese le cefalosporine di terza generazione, eccetto il Cefepime.

Nei ceppi clinici, la resistenza di tipo AmpC conferisce da sola il 50% della resistenza ai β -lattamici e coesiste frequentemente con quella dovuta all'espressione delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL).

Il gruppo ECC presenta anche una resistenza variabile agli aminoglicosidi, grazie alla presenza di determinanti di resistenza a codificazione plasmidica. Per quanto riguarda i chinoloni, è stata osservata una resistenza, sempre di origine plasmidica, dovuta alla proteina QnrA, che è stata identificata in oltre il 60% dei ceppi ¹.

1.2 Meccanismi di resistenza ai carbapenemi

Grazie alla genotipizzazione e al sequenziamento dell'intero genoma di numerosi isolati batterici clinici si è notevolmente ampliata la conoscenza di come emerge e si diffonde la resistenza agli antibiotici.

Comprendere i meccanismi di resistenza e l'epidemiologia di questi agenti patogeni è fondamentale per lo sviluppo di nuovi antibatterici e per le decisioni terapeutiche individuali, che spesso comportano alternative agli antibiotici β -lattamici.

Ci sono tre meccanismi principali attraverso i quali gli enterobatteri sviluppano resistenza ai carbapenemi: degradazione enzimatica attraverso la produzione di carbapenemasi, espressione delle pompe di efflusso e diminuzione della permeabilità della membrana esterna attraverso mutazioni delle porine ³.

Altri meccanismi possibili sono la produzione di extended-spectrum β -lactamase (ESBL) o una maggiore espressione di enzimi AmpC-like. Questi meccanismi possono anche coesistere, ma quello con maggiore rilevanza clinica e più frequente è la produzione di carbapenemasi, i cui geni codificanti sono per lo più collocati su elementi genetici mobili, quali trasposoni ed integroni, a loro volta presenti in plasmidi auto trasmissibili ⁴.

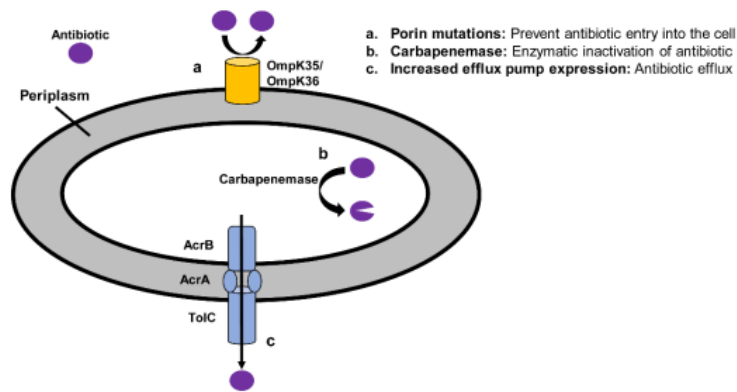


Figura 1. Meccanismi di resistenza ai carbapenemi delle *Enterobacteriaceae*³

1.2.1 Produzione di carbapenemasi

I β -lattamici sono un gruppo ampio e molto utilizzato di antibiotici, caratterizzati dalla presenza di un anello β -lattamico in grado di interferire con la sintesi del peptidoglicano. In base alla struttura chimica, sono suddivisi in: penicilline (come Amoxicillina e Oxacillina), cefalosporine (come Cefotaxime e Cefepime), monobattami (Aztreonam) e carbapenemi (come Ertapenem, Meropenem, Imipenem)⁵. Alcuni batteri risultano resistenti a questi antibiotici grazie alla produzione di enzimi chiamati β -lattamasi, codificati da uno o più geni *bla* presenti a livello plasmidico o cromosomiale, e possono essere inducibili o costitutivi. Ad oggi, sono state scoperte oltre 2000 β -lattamasi diffuse in tutto il mondo⁴, differenziabili secondo diversi aspetti, ma che sono accumulate dalla caratteristica di idrolizzare l'anello β -lattamico di tali antibiotici.

Le β -lattamasi sono classificate in base a diversi parametri funzionali e strutturali e il sistema più accreditato è il sistema di classificazione di Ambler in quattro classi molecolari A, B, C e D (Tabella 2)³. Gli enzimi carbapenemasi appartengono a tre delle quattro classi (A, B e D).

Ambler Class	β -Lactamases	Active Site Agent	Examples	Substrates
A	Penicillinases	Serine	PSE TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, GES KPC, SME, IMI/NMC-A	Penicillins Penicillins, 3rd generation cephalosporins All β -lactams
B	Metallo- β -lactamases	Zinc	IMP, VIM, NDM, SPM, GIM	All β -lactams, except monobactams
C	Cephalosporinases	Serine	AmpC	Cephameycins, 3rd generation cephalosporins
D	Oxacillinases	Serine	OXA	All β -lactams, though class D enzymes have highly variable spectra of activity

Abbreviations: CTX-M, active against cefotaxime (CTX) and isolated in Munich (-M); GES, Guiana extended spectrum; GIM, German imipenemase; IMP, active on imipenem; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo- β -lactamase; NMC, not metalloenzyme carbapenemase; OXA, oxacillinase; PER, *Pseudomonas aeruginosa* RNL-1; PSE, *Pseudomonas* specific enzyme; SHV, sulfhydryl reagent variable; SME, *Serratia marcescens* enzyme; SPM, Sao Paulo metallo- β -lactamase; VEB, Vietnamese extended-spectrum β -lactamase; VIM, Verona integron-encoded metallo- β -lactamase.

Tabella 2. Classificazione di Ambler delle β -lattamasi ³

Carbapenemasi di classe A: presentano un sito attivo a serina, sono costituite principalmente da KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi). Il gene che codifica per KPC, *blaKPC*, si è rapidamente diffuso tra diverse specie in virtù della sua localizzazione in elementi trasponibili all'interno di plasmidi coniugativi.

Carbapenemasi di classe B: denominate metallo- β -lattamasi (MBL), utilizzano lo zinco come cofattore essenziale nella scissione dell'anello β -lattamico. Negli enterobatteri troviamo principalmente gli enzimi metallo- β -lattamasi VIM, IMP e NDM.

Carbapenemasi di classe D: le serina-carbapenemasi di classe D sono costituite dalle β -lattamasi OXA, alcune delle quali sono in grado di idrolizzare i carbapenemi. Le carbapenemasi di classe D più comunemente riscontrate negli enterobatteri sono gli enzimi simili a OXA-48 ³.

1.2.2 Espressione delle pompe di efflusso

Un'altra strategia utilizzata dai batteri per resistere alla presenza degli antibiotici riguarda un meccanismo associato alla membrana, ovvero le pompe di efflusso.

Le pompe di efflusso sono trasportatori localizzati sulla membrana interna e pompano i farmaci dal citoplasma allo spazio periplasmatico; quindi, espellono efficacemente i composti antibatterici all'esterno della cellula batterica ¹. Una di queste pompe che si trova negli enterobatteri è la pompa AcrAB-ToIC che è un complesso tripartito che attraversa la membrana interna, il periplasma e la membrana esterna per espellere gli

antibiotici dalla cellula ³. L'espressione del complesso AcrAB-TolC è in grado di mantenere la concentrazione interna di antibiotici al di sotto della soglia necessaria per innescare la morte batterica ¹.

1.2.3 Mutazioni delle porine

Per quanto riguarda le porine ad oggi sono state individuate negli enterobatteri tre porine generali, Omp35, Omp36 e Omp37 e due ulteriori porine specifiche, LambB e PhoE; ciascuna porina è organizzata in trimeri stabili, ogni subunità contiene un canale idrofilo che presenta una tipica struttura a β -barile che attraverso una particolare organizzazione restringe il lume e crea un forte campo elettrico trasversale che guida la diffusione della molecola carica. Questi canali consentono il trasporto degli antibiotici attraverso la membrana esterna, garantendone l'accumulo all'interno dello spazio periplasmatico. Modificazioni dei sistemi di trasporto sono state osservate durante il trattamento antibiotico dei pazienti ¹, in particolare nelle porine Omp35 e Omp36: da una normale espressione di entrambe le porine negli isolati sensibili ai carbapenemi, alla produzione di Omp36 e alla perdita di Omp35 nei ceppi con sensibilità intermedia fino alla resistenza ai carbapenemi dimostrata dai ceppi privi di entrambe le porine. Inoltre, la porina Lamb può essere espressa in sostituzione di Omp35 e Omp36, generando una bassa suscettibilità ai β -lattamici. In particolare, la resistenza agli antibiotici è associata ad una mutazione chiave, una sostituzione amminoacidica (Glicina \rightarrow Acido aspartico) a livello di una regione specifica di Omp36, che determina una modifica conformazionale tale da alterare la conduttanza e la selettività della proteina ¹.

1.3 Meccanismi di trasferimento genetico orizzontale

Grazie alla presenza di elementi genetici mobili (MGE), segmenti di DNA che codificano per enzimi e altre proteine che mediano il movimento del DNA, si può verificare sia una mobilità all'interno dei genomi (mobilità intracellulare) sia tra cellule batteriche (mobilità intercellulare). Quest'ultima può coinvolgere membri della stessa specie o appartenenti a specie anche molto distanti filogeneticamente.

Il movimento intercellulare assume tre forme nei procarioti: trasformazione, trasduzione e coniugazione.

La trasformazione è stato il primo meccanismo di trasferimento genetico orizzontale ad essere stato scoperto. Questo processo comporta il trasferimento genetico, mediato dall'assorbimento di DNA esogeno, tra batteri strettamente correlati grazie a delle proteine codificate cromosomicamente che sono prodotte da alcuni batteri naturalmente trasformabili durante lo stato definito di competenza.

La trasduzione invece è una forma di trasferimento del DNA mediata da virus batterici che si replicano indipendentemente chiamati batteriofagi (o fagi). Durante l'assemblaggio dei componenti virali i batteriofagi possono impacchettare accidentalmente nel proprio capsido dei segmenti di DNA ospite e successivamente iniettarlo in una nuova cellula ospite, all'interno della quale il DNA può ricombinarsi con il cromosoma cellulare ed essere ereditato. I genomi dei fagi possono essere composti da DNA o RNA ed i loro geni essenziali caratteristici comprendono specifici geni della replicasi, geni che codificano componenti fagiche che "dirottano" il meccanismo replicativo della cellula ospite e geni che codificano le proteine che impacchettano il DNA in un rivestimento proteico denominato capsido. I batteriofagi virulenti presentano unicamente un ciclo litico che porta alla lisi dei batteri ospiti. I batteriofagi temperati presentano una fase non litica del ciclo di riproduzione chiamata lisogenia. Nella maggior parte dei casi noti di lisogenia, il genoma del fago si integra nel cromosoma batterico e si replica con esso come profago, ma in alcuni casi il genoma del fago si replica autonomamente come un plasmide circolare o lineare.

Infine, la coniugazione rappresenta un importante meccanismo di trasferimento genetico orizzontale attraverso il quale il DNA viene trasferito da un batterio donatore ad un batterio ricevente per contatto diretto⁶.

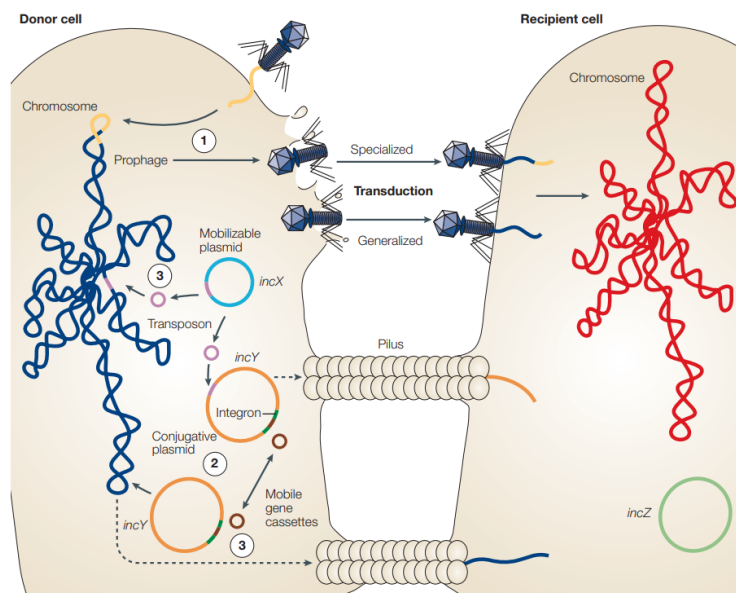


Figura 2. Trasferimento di DNA tra cellule batteriche ⁶

1.3.1 Coniugazione

La coniugazione fu scoperta per la prima volta nel 1946 da Edward Tatum e Joshua Lederberg, che dimostrarono che i batteri potevano scambiarsi informazioni genetiche attraverso il trasferimento unidirezionale del DNA, mediato da un cosiddetto fattore F (Fertility). Successivamente si è capito che il fattore F è un elemento extracromosomico replicativo, per il quale in seguito hanno coniato il termine plasmide, che può essere trasferito attraverso le membrane cellulari da ceppi parentali.

Oltre ai plasmidi, possono essere coinvolti altri elementi coniugativi come i trasposoni coniugativi e gli elementi coniugativi integrativi (ICE).

La coniugazione facilita l'adattamento dei ceppi batterici mediando la propagazione di proprietà metaboliche vantaggiose, come lo stile di vita simbiotico, la virulenza o la resistenza ai metalli pesanti e agli antimicrobici. La coniugazione è quindi uno dei principali motori della rapida evoluzione dei genomi batterici ⁷.

Un plasmide è un insieme di moduli genetici funzionali che sono organizzati in un'entità stabile e autoreplicante o "replicon", solitamente con dimensioni minori del cromosoma cellulare e che di solito non contiene geni necessari per le funzioni cellulari essenziali.

I plasmidi classici sono molecole di DNA circolari a doppio filamento chiuse in modo covalente, ma plasmidi di DNA lineari a doppio filamento sono stati trovati in un numero crescente di specie.

L'anatomia generale di un plasmide include geni necessari per il loro mantenimento durante la segregazione verticale dalla cellula madre alle cellule figlie, nonché i geni necessari per il trasferimento genetico orizzontale durante la coniugazione da una cellula donatrice a quella ricevente e un assortimento variabile di geni accessori che codificano processi distinti da quelli codificati dal cromosoma batterico e che offrono un vantaggio selettivo. Tali tratti accessori possono essere accumulati nella cellula senza alterare il contenuto genico del cromosoma batterico ⁶.

I plasmidi infatti devono replicarsi, controllare il loro numero di copie e garantire la loro eredità a ogni divisione cellulare mediante un processo noto come partizionamento.

È impossibile che plasmidi con lo stesso meccanismo di replicazione coesistano nella stessa cellula, fenomeno chiamato incompatibilità (Inc). Il tratto Inc ha fornito la base per la classificazione iniziale di alcuni plasmidi che è ancora in uso oggi. Negli enterobatteri sono stati definiti 26 gruppi di incompatibilità plasmidica. Il numero di gruppi di incompatibilità di grandi plasmidi in questi batteri sembra raggiungere un plateau ⁶, quindi, potrebbe esserci un numero finito di meccanismi di replicazione di successo in un dato gruppo batterico.

La complessità del plasmide aumenta con le dimensioni e i cosiddetti “mega plasmidi” possono avere le dimensioni di piccoli cromosomi e possono contenere diversi repliconi compatibili cointegrati. Molti isolati batterici naturali contengono in genere piccoli plasmidi spesso trasferiti in un'altra cellula grazie all'ausilio di un plasmide coniugativo più grande o da un ICE, processo noto come mobilizzazione.

Il plasmide F, usato come modello dei sistemi coniugativi nei batteri Gram-negativi, presenta una regione *tra* che codifica tutti i geni coinvolti nel trasferimento, una sequenza origine del trasferimento *oriT*, una regione principale che è la prima ad essere trasferita nella cellula ricevente e una regione funzionale di manutenzione coinvolta nella replicazione e partizione del plasmide ⁷. L'inizio della coniugazione richiede l'espressione dei geni *tra* con la produzione di alcune proteine che formano il sistema di secrezione di tipo IV (T4SS) ed il pilo proteico coniugativo. L'intero apparato funge da connessione con la cellula ricevente e media la stabilizzazione con essa.

Altre proteine *tra* costituiscono il relaxosoma (TraI, TraM e TraY) che innesca la prima serie di eventi; in combinazione con il fattore ospite di integrazione (IHF) si legano all'*oriT* per preparare il plasmide per il trasferimento inducendo la reazione di scissione di uno dei filamenti di DNA da parte della relaxasi TraI (relaxase/nickase). L'interazione tra il relaxosoma e la proteina di accoppiamento di tipo IV (T4CP) avvia il trasferimento del filamento di ssDNA da parte del T4SS. Il trasferimento del filamento legato a TraI nel ricevente è concomitante con la conversione del ssDNA in dsDNA mediante il meccanismo *Rolling Circle Replication* (RCR) nel donatore. Al termine, del processo, e una volta completata la conversione del plasmide ssDNA in dsDNA in entrambi gli ambienti cellulari, l'espressione genica del plasmide determina la conversione fenotipica della cellula ricevente in una cellula transconiugante ⁷.

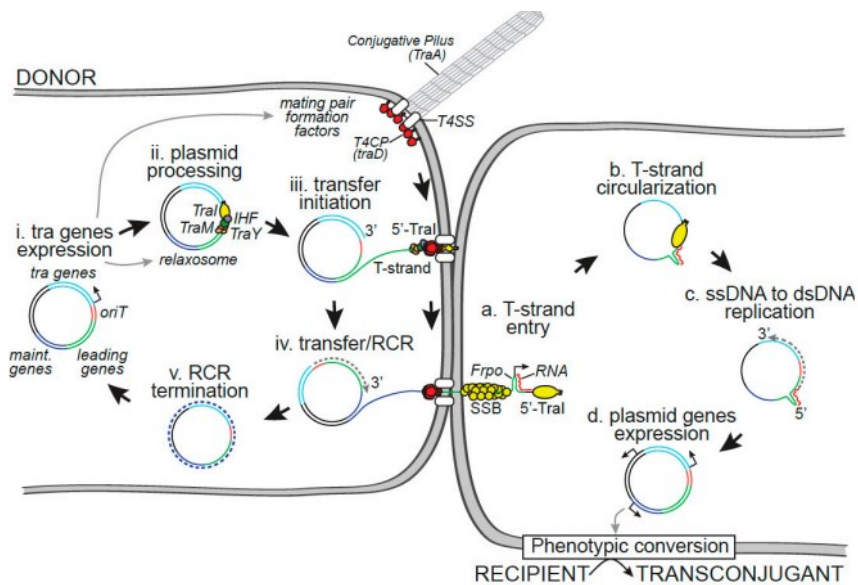


Figura 3. Diagramma schematico del ciclo di vita del plasmide F durante il trasferimento coniugativo dal donatore alla cellula ricevente ⁷

1.4 Scopo della ricerca

Nell'ambito della resistenza antimicrobica, particolare importanza riveste la resistenza ai carbapenemi considerati antibiotici di ultima istanza per il trattamento delle infezioni causate da batteri Gram- negativi MDR. Al giorno d'oggi la produzione di carbapenemasi rappresenta il principale meccanismo di resistenza ai carbapenemi in *Enterobacterales*⁸. La diffusione dei ceppi resistenti ai carbapenemi mediante la produzione di carbapenemasi (CP-CRE) è favorita dal fatto che i geni codificanti le carbapenemasi sono spesso veicolati da diversi tipi di plasmidi coniugativi che possono essere facilmente trasferiti da un ceppo all'altro e tra specie diverse della famiglia. Uno studio di sorveglianza ha riportato che in Francia (e in altre parti dell'Europa occidentale) le carbapenemasi prodotte da *Enterobacterales* sono principalmente: OXA-48 (82%), VIM (7%), NDM (5%), IMI (2,5%), IMP (0,8%) e KPC (0,8%). Tra il 2012 e il 2014 in Francia, gli isolati ECC erano la terza specie più comune (9,9%) tra gli *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi. Il numero di ECC produttori di carbapenemasi è aumentato costantemente da 29 nel 2012 a 288 nel 2018. Rispetto al periodo precedente è stato quindi osservato un aumento significativo nel numero di isolati ECC produttori di carbapenemasi di tipo VIM raccolti ed analizzati dal 2015 al 2018 presso il Centro nazionale di riferimento francese (F-NRC) per la resistenza antimicrobica. Inoltre, le carbapenemasi di tipo VIM erano il secondo tipo più diffuso di carbapenemasi nell'ECC nel 2018: il tasso di ceppi ECC VIM-positivi è passato dal 3,4% nel 2012 al 24,7% nel 2018⁸. Anche in Italia sono state riportate diverse segnalazioni di ceppi CP-CRE produttori di VIM⁹. Il primo rilevamento dell'enzima metallo- β -lattamasi VIM-1 è stato riportato in *Pseudomonas aeruginosa* nel 1997. Fino al 2020, 73 varianti del gene *bla*VIM sono state riportate nel database nazionale degli organismi resistenti agli antibiotici¹⁰. Lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare il contenuto plasmidico di una collezione di ceppi resistenti ai carbapenemi e produttori della carbapenemasi di tipo VIM. Una volta identificato il plasmide che veicola *bla*VIM, sono stati condotti esperimenti di coniugazione per valutarne il trasferimento orizzontale interspecifico, analizzando le condizioni che influenzano questo processo. Per lo studio sono stati utilizzati differenti ceppi donatori isolati da campioni clinici di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche nel periodo 2019-2023.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

In questo studio sono stati selezionati come donatori ceppi batterici appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, provenienti dall’Azienda Ospedaliera “Ospedali Riuniti” di Ancona Torrette, isolati da diversi materiali clinici nel periodo compreso tra 2019 e la prima metà del 2023 (Tabella 3).

	Ceppo	ID	Materiale	Reparto	Anno
<u>Gruppo</u> <u>1</u>	ECC 1	526797	Urine	Oncologia	2019
	ECC 3	554180/3	Urine	Nefrologia	2019
<u>Gruppo</u> <u>2</u>	ECC 11	766462	Urine	Clinica di malattie infettive	2022
	ECC 12	770821	Urine	Clinica di malattie infettive	2022
	ECC 14	825795	Tampone rettale	Clinica di malattie infettive	2023
	<i>K. pneumoniae</i> 3	773964/1	urine	Clinica di malattie infettive	2022

Tabella 3. Ceppi utilizzati come donatori e dati di isolamento

Tutti i ceppi selezionati sono resistenti ai carbapenemi per l’espressione del gene *blaVIM-1* che codifica per la metallo-carbapenemasi. Il gene è portato da plasmidi che appartengono a gruppi Inc differenti. In Tabella 4 sono riportate le principali caratteristiche genotipiche dei ceppi donatori, compreso il sequence type (ST) di appartenenza.

Ceppo	ST	Gruppo Inc	Dimensioni (kb)	Geni di resistenza
ECC 1	45	N	40	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; aadA1; catB2; qacE; sul1; mph(A); qnrS1
ECC 3	45	N	40	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aph(3')-XV; aadA1; catB2; qacE; sul1; mph(A); qnrS1
ECC 11	286	A	200	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A)
ECC 12	286	A	200	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); qnrA1
ECC 14	62	A	200	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); qnrA1
KPN 3	39	A	200	blaVIM-1; aac(6')-Ib-cr; aadA1; catB2; qacE; sul1; blaSHV-12; mph(A); dfrA14

Tabella 4. Caratteristiche genetiche dei plasmidi che portano *blaVIM-1* nei ceppi donatori.

Come riceventi invece sono stati utilizzati tre differenti ceppi di *Escherichia coli*, due dei quali sono ceppi di riferimento per studi genetici (J53 Azide^R) e per il controllo di qualità dei test di suscettibilità agli antibiotici (ATCC 25922).

E. coli J53 è stato utilizzato per esperimenti di coniugazione in Canada. Questo ceppo, appartenente al sierotipo O10, è un mutante di laboratorio negativo per i fattori di fertilità ed è resistente al sodio azide, che rappresenta il marcatore cromosomico utile per la selezione dei transconiuganti negli esperimenti di trasferimento. Il DNA dell'intero genoma è stato sequenziato utilizzando entrambi i sistemi Illumina NexSeq500 e Oxford

Nanopore Technologies MinION, contiene un cromosoma di 4,650,823 bp e non presenta plasmidi. La sequenza completa del cromosoma di *E. coli* J53 è stata depositata in GenBank con il numero di accesso CP028702 ¹¹.

E. coli ATCC 25922 è un ceppo di controllo di qualità comunemente usato, in particolare nei test di sensibilità anticorpale. È stato originariamente isolato da un campione clinico umano raccolto a Seattle, Washington (1946) ed è di sierotipo O6. Il DNA genomico è stato sequenziato con le tecnologie Illumina e Roche454. L'assemblaggio completo del genoma include un cromosoma (5,130,767 bp) e due plasmidi (rispettivamente 48,488 e 24,185 bp) ed è disponibile in GenBank con il numero di accesso CP009072 ¹².

Per il nostro studio questo ceppo è stato modificato in laboratorio e reso mutante resistente alla Colistina, al fine di ottenere un miglior marcatore per la selezione dei transconiuganti. Il ceppo è stato ottenuto attraverso una serie di passaggi seriali colturali, aumentando la concentrazione di Colistina fino al raggiungimento di un valore di MIC di 16 mg/L.

Il terzo ceppo (506959) era stato isolato nel 2019 da un campione fecale di un paziente dell'Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti" di Ancona Torrette, nel corso di un precedente studio di screening sulla diffusione dei geni di resistenza ai carbapenemi in ceppi colonizzanti ¹³. Il sequenziamento genomico, condotto mediante tecnologia Nanopore, ha fornito dati sul contenuto plasmidico e sui geni di resistenza. Le caratteristiche genetiche dei tre ceppi usati come riceventi sono riportate nella Tabella 5.

ID (Sequence Type)	Plasmidi gruppo Inc (bp)	Geni di resistenza	Accession no. (Ref)
506959 (ST131)	FIA; FIB (AP001918); FII (pRSB107) Col(MG828) Col440II	OXA-1; CTX-M-15; AAC(6')-Ib-cr3; AAC(3)-IIe - -	Questo studio
J53 Az ^R (ST10)	-	-	CP028702
ATCC 25922 (ST73)	IncFII (48,488) IncX1 (24,185)	- -	NZ_CP009073 NZ_CP009074

Tabella 5. Caratteristiche genetiche dei tre ceppi *E. coli* usati come riceventi

2.2 Coniugazione

Il trasferimento del gene *blaVIM* contenuto nei plasmidi IncA ed IncN dei diversi ceppi donatori è stato studiato attraverso esperimenti di coniugazione eseguiti *in vitro* utilizzando la metodica *filter mating*.

Procedimento

1. Si prelevano sterilmente delle colonie di donatore e ricevente, cresciute overnight, per preparare una sospensione standardizzata di cellule donatrici e di cellule riceventi;
2. Si stemperano in 3 ml di brodo MH per ottenere una sospensione con densità ottica 0,2 misurata ad una lunghezza d'onda pari a 625 nm;
3. In una provetta si uniscono 1 ml di sospensione del donatore ed 1 ml di sospensione del ricevente lasciandoli in incubazione a 37°C per 1 ora;
4. Si filtra la sospensione batterica utilizzando un apparato di filtrazione accoppiato ad una pompa aspirante, che consente il passaggio del brodo attraverso un filtro con pori di diametro 0,20 µm;
5. Al termine della filtrazione si preleva sterilmente il filtro che va applicato sulla superficie di una piastra di MH e si lascia in incubazione a 37°C per 4 ore;
6. Al termine dell'incubazione si procede con il lavaggio: si preleva sterilmente il filtro dalla piastra trasferendolo in una provetta contenente 10 ml di soluzione fisiologica;
7. Si agita la provetta al vortex per consentire il distacco delle cellule batteriche dal filtro alla soluzione fisiologica. Il filtro viene scartato;
8. Si centrifuga la provetta a 6.000 x g per 10 minuti scartando il surnatante;
9. Si risospende il pellet in 1 ml di soluzione fisiologica (intero);
10. Si procede allestendo diluizioni scalari 1:10:
 - si allestiscono 10 eppendorf con 900 µl di soluzione fisiologica;
 - si prelevano 100 µl dalla sospensione iniziale e si mescolano ai 900 µl della prima eppendorf (diluizione 1:10); si procede analogamente con le diluizioni successive.
 - Al termine della procedura, si ottiene la serie di diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻¹⁰;

11. Aliquote di ciascuna diluizione vengono seminate nelle rispettive piastre di selezione per la conta finale del donatore, del ricevente e degli eventuali transconiuganti:
 - Si divide una piastra di selezione per il donatore in 10 settori corrispondenti alle diluizioni, si prelevano 10 µl da ogni diluizione e si lascia depositare la goccia sui rispettivi settori nella piastra;
 - Si ripete il punto precedente utilizzando una piastra di selezione per il ricevente;
 - Si seminano a questo punto le piastre di selezione per eventuali transconiuganti, utilizzando la tecnica di semina per spatolamento: si seminano due piastre con 150 µl di diluizione 10^{-2} , due piastre con 150 µl di diluizione 10^{-1} ed in fine due piastre con 150 µl di intero;
12. Si pongono tutte le piastre in incubazione a 37°C overnight;
13. Al termine dell'incubazione si procede con la conta:
 - Per il donatore ed il ricevente si contano le colonie nel quadrante che presenta colonie isolate e ben distinguibili, il numero delle colonie viene poi moltiplicato per il fattore di diluizione. Per risalire al numero di cellule presenti nel nostro intero si rapporta il numero ottenuto con il volume totale dell'intero (CFU/ml);
 - Per i transconiuganti si contano tutte le colonie presenti in ciascuna piastra moltiplicando per il fattore di diluizione. Infine, per risalire al numero di cellule presenti nella sospensione iniziale, si rapporta il numero ottenuto con il volume totale dell'intero (CFU/ml di transconiuganti);
 - Per valutare l'efficienza di coniugazione si calcola il rapporto tra CFU/ml transconiuganti/ricevente e transconiuganti/donatore;
14. Si conservano gli eventuali transconiuganti cresciuti nelle rispettive piastre di selezione per le prove di conferma.

La successiva Tabella 6 riporta l'elenco di tutti gli incroci eseguiti con differenti ceppi donatori e riceventi (e loro principali caratteristiche) ed i marcatori antibiotici utilizzati per la selezione dei ceppi transconiuganti.

N°	Donatore (caratteristiche)	Ricevente (caratteristiche)	Fattori di selezione dei ceppi transconiuganti
1	ECC1 (VIM-1; IncN)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
2	ECC3 (VIM-1; IncN)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
3	ECC3 (VIM-1; IncN)	<i>E. coli</i> J53 (Sodio Azide R)	Sodio azide (200 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
4	ECC11 (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
5	ECC11 (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> J53 (Sodio Azide R)	Sodio azide (200 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
6	ECC11 (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colistina R)	Colistina (10 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
7	ECC12 (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
8	ECC14 (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
9	KPN 3 (773964/1) (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> 506959 (Ciprofloxacina R)	Ciprofloxacina (8 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
10	KPN 3 (773964/1) (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> J53 (Sodio Azide R)	Sodio azide (200 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)
11	KPN 3 (773964/1) (VIM-1; IncA)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colistina R)	Colistina (10 µg/ml) Ertapenem (1 µg/ml)

Tabella 6. Elenco degli incroci eseguiti

Per la crescita, la selezione e la conta di tutti i ceppi donatori è stato utilizzato l'Agar Mc Conkey (Oxoid) addizionato con Ertapenem (1 µg/ml).

Per la crescita, la selezione e la conta dei ceppi riceventi *E. coli* 506959 e ATCC 25922 mutante Colistino-R è stato utilizzato l'Agar Mc Conkey con l'aggiunta di specifici fattori selettivi, rispettivamente Ciprofloxacina (8 o 10 µg/ml) e Colistina (10 µg/ml).

Negli incroci in cui veniva utilizzato il ceppo ricevente di *E. coli* J53 (resistente al Sodio Azide) la selezione è stata condotta mediante piastre di Blood Azide Agar base (Liofilchem) che ha una concentrazione finale di 200 µg/ml di Sodio azide, addizionato con 5% di sangue di montone.

2.3 Analisi fenotipica dei transconiuganti

Tutti i transconiuganti ottenuti negli incroci sono stati studiati per le loro caratteristiche fenotipiche mediante diversi metodi di analisi.

2.3.1 Antibiogramma

La valutazione qualitativa della sensibilità agli antibiotici è stata eseguita tramite il metodo della disco-diffusione in agar, secondo le direttive dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ¹⁴.

Procedimento

A partire da colture pure dei ceppi, cresciute overnight a 37°C, si allestisce una sospensione in Mueller Hinton brodo (MHB) e si effettuano opportune diluizioni in modo da ottenere un inoculo standardizzato con densità ottica 0.1 misurata ad una lunghezza d'onda di 625 nm, che corrisponde a circa 1×10^8 Unità Formanti Colonie per ml (UFC/ml). Con un tampone sterile si distribuisce in maniera uniforme l'inoculo sulla superficie di una piastra Mueller Hinton agar (MHA), si applicano sterilmente i dischetti degli antibiotici e si procede all'incubazione in ambiente aerobio a 37°C overnight. Infine, si misurano gli eventuali aloni di inibizione rapportandoli con i valori di riferimento.

2.3.2 Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il metodo della microdiluzione in brodo è stato utilizzato per saggiare la sensibilità dei transconiuganti agli antibiotici in accordo con le procedure standardizzate EUCAST.

Procedimento

Opportune diluizioni scalari in Mueller Hinton II Brodo (CAMHB) delle soluzioni stock di antibiotico sono state cimentate con una concentrazione fissa di inoculo standardizzato dei ceppi da esaminare pari a 5×10^5 CFU/ml. Le piastre microtiter sono state incubate in aerobiosi a 37°C per 18-24h. Il ceppo di *E. coli* ATCC 25922 è stato utilizzato in tutti gli esperimenti come controllo di qualità. Il valore della minima concentrazione inibente (MIC) è dato dalla più bassa concentrazione di antibiotico in cui non è visibile la crescita batterica. L'interpretazione dei dati ottenuti è stata eseguita secondo i valori di breakpoint forniti dall'EUCAST¹⁵.

2.3.3 Test fenotipici per evidenziare l'attività carbapenemasi (mCIM)

Per documentare la presenza di un'attività carbapenemasi è stato utilizzato il metodo mCIM (*Modified Carbapenem Inactivation Method*) secondo la letteratura di riferimento¹⁶.

Procedimento

1. Si sospendono aliquote (1 µl) del ceppo da testare in 2 ml di Tryptic Soy Broth (TSB);
2. Si agita la sospensione batterica ottenuta al vortex per 15-20 secondi;
3. Si aggiunge poi sterilmente un dischetto di Meropenem (MEM) da 10 µg e si pone in incubazione per 4 ore a 37°C;
4. Poco prima del termine del tempo di incubazione stabilito per l'inattivazione del carbapenemico, si prepara una sospensione 0.5 McFarland del ceppo indicatore (*Escherichia coli* ATCC 25922), da distribuire in modo uniforme sulla superficie di piastre MHA;
5. Al termine delle 4 ore si rimuove il dischetto di MEM dalla sospensione batterica in TSB mediante un'ansa da inoculo da 10 µl; in particolare si trascina l'ansa lungo il bordo della provetta durante la rimozione, in modo da eliminare l'eccesso di liquido;
6. Si posiziona il dischetto di MEM sulla piastra di MHA preparata con il ceppo reporter e si procede all'incubazione per 24 ore a 37°C;

L'interpretazione del test consiste nel valutare i diametri degli aloni di inibizione del ceppo reporter ATCC 25922 nei confronti dei dischetti di MEM precedentemente incubati con i ceppi in esame sospettati di produrre carbapenemasi.

2.4 Analisi molecolare dei transconiuganti e procedure di tipizzazione

Il trasferimento di *bla*VIM-1, IncN o IncA è stato verificato attraverso la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando coppie specifiche di primer. Per confermare la presenza dei transconiuganti, ed escludere eventuali mutanti resistenti, è stata invece applicata la tecnica di tipizzazione Pulsed Field Gel Electrophoresis (RFLP-PFGE).

2.4.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di amplificazione genica che permette di ottenere rapidamente milioni di copie identiche di DNA a partire da una quantità iniziale molto ridotta di acido nucleico, che funge da stampo. Si basa sull'alternarsi di 3 fasi, denaturazione, annealing e polimerizzazione, per un certo numero di cicli, a tre temperature differenti, tutto questo viene svolto in maniera automatizzata attraverso il termociclatore. In questo studio è stata utilizzata per la ricerca di *bla*VIM-1, IncN o IncA utilizzando i primer illustrati nella tabella 7 e la DreamTaq della ditta Thermo Fisher Scientific. L'eventuale presenza del gene in studio viene poi confermata attraverso l'elettroforesi su gel d'agarosio.

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')	Dimensioni (bp)	Bibliografia
VIM	VIM F	GATGGTGTGGTTCGCATA	438 bp	Poirel 2011
	VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG		
repA	IncA/C_FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465 bp	Carattoli 2005
	IncA/C_RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
repA	IncN FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559 bp	Carattoli 2005
	IncN RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		

Tabella 7. Primer utilizzati per la ricerca dei vari geni ¹⁷⁻¹⁸

2.4.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (RFLP-PFGE)

Per escludere la presenza di mutanti resistenti e confermare la presenza di transconiuganti, è stata utilizzata la procedura di tipizzazione RFLP-PFGE, attraverso una digestione enzimatica con opportuni enzimi di restrizione, seguita da elettroforesi in campo pulsato (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE). La procedura consente di ottenere dei profili di restrizione dei campioni in esame, che possono essere confrontati. In presenza di veri transconiuganti, il profilo di restrizione atteso è identico o strettamente correlato ai profili dei diversi riceventi utilizzati, che vengono fatti correre in parallelo.

Per le ulteriori indagini di tipizzazione, con lo scopo di studiare il contenuto plasmidico dei transconiuganti (n° e dimensione molecolare) e studiare quali plasmidi sono stati trasferiti durante la coniugazione è stata utilizzata la procedura di PFGE previa digestione enzimatica con l'enzima S1 (Sigma-Aldrich).

I frammenti che si ottengono dalla digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione, e la loro posizione dopo la corsa forma il cosiddetto "Dna fingerprint" specifico per ogni clone di ogni specie ¹⁹. Inoltre, la tipizzazione molecolare permette lo studio dei plasmidi.

La PFGE è una particolare tecnica di elettroforesi che permette di separare frammenti di DNA di dimensioni maggiori (10–800 kb) rispetto alla classica elettroforesi, grazie all'applicazione di un campo elettrico che cambia ripetutamente direzione. L'angolo compreso tra gli elettrodi e la velocità di questo cambiamento sono determinati dai valori di switch time, field angle e ramping factor.

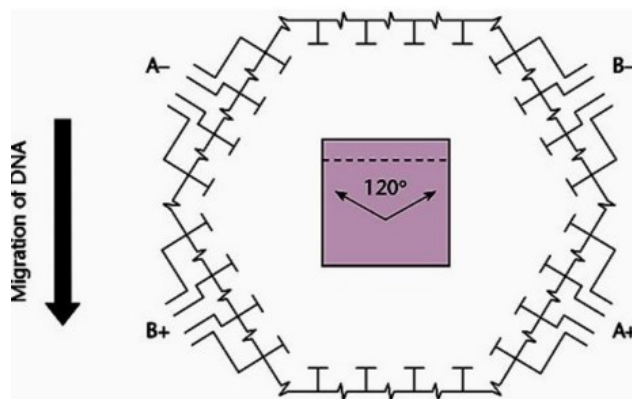


Figura 4. Illustrazione dello schema della PFGE

Ci siamo attenuti al protocollo di letteratura (Hunter, 2005; [PFGE | PulseNet International](#)), apportando qualche modifica: (1) Low Melt Agarose all'1,6% invece che all'1% come da protocollo; (2) aggiunta di Proteinasi K dopo la solidificazione delle plugs.

Procedimento

Preparazione delle plugs

- Dopo l'incubazione dei campioni overnight a 37°C, si preleva sterilmente una piccola quantità di colonie e si sospende in 2 ml di Suspension Buffer (100 mM Tris + 100 mM EDTA pH 8.0 + acqua sterile ultrapura);
- Standardizzare gli inoculi, fino ad ottenere una densità ottica di 0,8 (range 0,570-0,820) misurando a 610 nm;
- Mettere in un eppendorf 400 µl della sospensione batterica e aggiungere 400 µl di Agarosio Low Melt al 1,6% [91,6% di Agar e 1% di SDS (sodio dodecilsolfato)] e prelevare 100 µl da inserire nell'apposito stampino "plug mold" per creare le plugs. La solidificazione è stata accelerata ponendo i supporti a 4°C;

Lisi cellulare

- Quando sono ben solidificate, si trasferiscono le plugs in una provetta contenente 5 ml di Lysis buffer (50 mM Tris + 50 mM EDTA pH 8.0 + 1% Sarcosyl) e 25 µl di proteinasi K (20 µg/ml) per permettere la lisi cellulare e la fuoriuscita del DNA, si lasciano in incubazione a 54°C per 2 ore;

- Al termine delle 2 ore si effettuano 6 lavaggi totali: 2 lavaggi con 5 ml di acqua sterile ultrapura e 4 con TE Buffer (10 mM Tris + 1 mM EDTA pH 8.0 + acqua sterile ultrapura), entrambi pre-riscaldati a 55°C;
- Dopo l'ultimo lavaggio, si aggiungono 5-10 ml di TE buffer a temperatura ambiente e si mantengono le plugs in frigorifero a 4°C.

Digestione enzimatica con XbaI e S1

- Preparare in un eppendorf da 2 ml il buffer specifico, l'enzima e l'acqua sterile, poi aggiungere circa metà plug;
- Incubare: a 37°C per 1 ora e mezza (XbaI), a temperatura ambiente per 30 minuti (S1);
- Bloccare la digestione enzimatica aggiungendo 500 µl di EDTA (0,1M, pH=8) e si lascia agire per 10 minuti;

Per la digestione enzimatica sono stati utilizzati due enzimi XbaI e S1. XbaI è un enzima di restrizione che taglia infrequentemente il DNA dei batteri Gram negativi e permette di visualizzare e confrontare i profili dei vari ceppi in esame. L'enzima S1 è una nucleasi, prodotta da *Aspergillus oryzae*, che consente di evidenziare il numero di plasmidi in un determinato ceppo batterico. La digestione viene condotta con 40 U di XbaI a 37°C per 2 ore, mentre con S1, 75U per 30 minuti a temperatura ambiente;

Preparazione del gel

- Far aderire il marker specifico e le plugs digerite sul "pettine" di supporto, con l'ausilio di una piccola quantità di low melting-point agarose preriscaldato; i marker che sono stati utilizzati sono: Lambda PFG Ladder (Size range: 48.5 - 1,018 kb, New England Biolabs) per XbaI e MidRange PFG Marker (Size range: 15–291 kb, New England Biolabs) per S1;
- Posizionare il pettine nell'apposito sistema e versare delicatamente il gel Pulsed Field Certified Agarose all'1% (Bio-Rad) precedentemente preparato, in modo che le plugs vengano inglobate nel gel prima che si solidifichi;
- Rimuovere il pettine quando il gel è ben solidificato e caricare il gel nell'apparecchiatura per la PFGE, Chef Mapper XA System (Biorad);

Corsa elettroforetica

In questo studio le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchiatura CHEF MAPPER XA SYSTEM (Bio-Rad) collegata ad una pompa refrigerante che mantiene la temperatura del TBE 0,5X (10 mM Tris + 1 mM EDTA pH 8.3 + acqua sterile ultrapura) a circa 14 °C secondo le seguenti condizioni:

Parametri	XbaI	S1
Run time	22 ore	18 ore
Field Angle	120°	120°
Initial Switch Time	2,2 secondi	0,5 secondi
Final Switch Time	54,2 secondi	20 secondi
Ramping Factor	Lineare	Lineare
Gradient	6 V/cm	6 V/cm
Temperature	14°C	14°C

Tabella 8. Parametri utilizzati

Lettura finale

La visualizzazione delle bande è stata effettuata al transilluminatore ad UV dopo aver lasciato colorare il gel in Etidio Bromuro 0,5 µg/ml per 30 minuti. L'interpretazione del profilo di bande ottenuto, secondo i criteri della PFGE, segue la classificazione riportata nella seguente tabella 9.

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

Tabella 9. Criteri per l'interpretazione dei profili PFGE ²⁰

3. RISULTATI

3.1 Risultati ottenuti dalle coniugazioni effettuate con i ceppi del gruppo 1

Dall'analisi delle cellule ottenute nell'incrocio tra donatore ECC1 e ricevente *E. coli* 506959, sono stati riscontrati dei mutanti resistenti alla Ciprofloxacina. Le indagini genomiche mediante XbaI-PFGE evidenziano difatti un profilo di restrizione identico a quello del donatore. Le indagini fenotipiche evidenziano un resistotipo identico al donatore ma con un aumento del livello di resistenza alla Ciprofloxacina, dovuto presumibilmente ad una maggiore espressione del gene residente *qnrS1*.

Le informazioni genetiche relative al donatore ECC3 indicavano la presenza di un plasmide aggiuntivo, con caratteristiche favorevoli la coniugazione. Tuttavia, anche in questo caso, l'incrocio con *E. coli* 506959 non ha prodotto veri transconiuganti, ma mutanti resistenti alla Ciprofloxacina; presumibilmente questo fenomeno è dovuto ancora una volta ad una maggiore espressione del gene *qnrS1*.

Nonostante siano state effettuate ripetute prove di coniugazione non sono mai stati ottenuti transconiuganti.

3.2 Risultati ottenuti dalle coniugazioni effettuate con i ceppi del gruppo 2

La Tabella 10 seguente riporta i risultati dell'incrocio tra l'ECC11 e i diversi ceppi riceventi di *E. coli*.

Ceppo	CFU/ml	Frequenza (D)	Frequenza (R)
ECC11	$8,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$
<i>E. coli</i> 506959 CipR	$1,8 \cdot 10^7$		
ECC11	$2,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-7}$
<i>E. coli</i> J53 AzR	$4,0 \cdot 10^8$		
ECC11	$4,0 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ColR	$1,8 \cdot 10^9$		

Tabella 10. Risultati incrocio interspecifico con ECC11

Prima di tutto si è osservata una differente crescita microbica durante la fase in filtro di 4 ore tra le cellule del donatore e dei diversi riceventi, più marcata con l'uso di J53 e ATCC

25922. Tale differenza potrebbe essere dovuta a fenomeni di competizione per i nutrienti o ad altre dinamiche di interazione batterica in uno stesso ambiente.

Al contrario delle frequenze di coniugazione in funzione del donatore (D) che sono comparabili, i valori ottenuti in funzione dei riceventi (R) mostrano delle differenze significative. In particolare, utilizzando *E. coli* 506959 è stata ottenuta una frequenza pari a $1,4 \cdot 10^{-4}$ mentre negli incroci interspecifici con gli altri riceventi la frequenza risulta essere di tre logaritmi più bassa (Tabella 10). Un primo risultato è una migliore efficienza di coniugazione dimostrata dal ricevente *E. coli* 506959.

Di alcuni transconiuganti, selezionati in modo casuale, sono stati prima di tutto analizzati i profili di restrizione mediante XbaI-PFGE per convalidare i risultati dell'incrocio ed escludere mutanti resistenti (Figura 5).

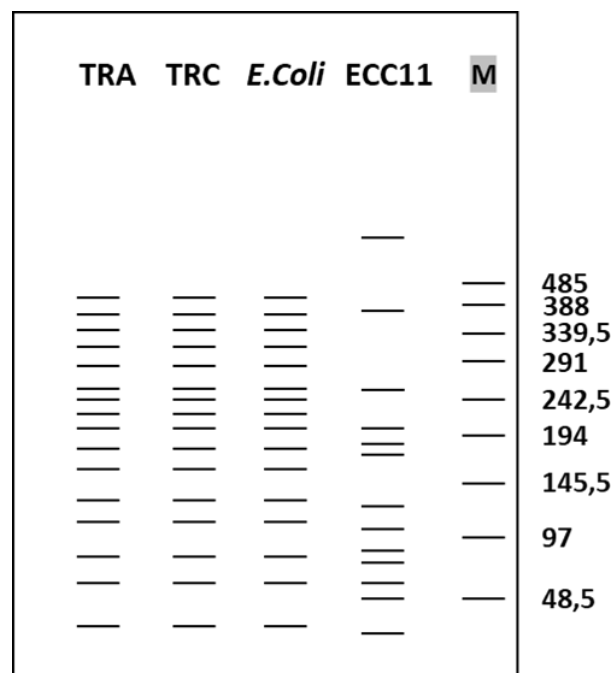


Figura 5. Profili di restrizione XbaI dei transconiuganti

TC-TRA/TC-TRC, del ricevente *E. coli* 506959 e del donatore ECC11

La successiva indagine mediante S1-PFGE ha evidenziato che i transconiuganti contenevano un plasmide di circa 200 kb analogamente al ceppo donatore ECC11.

Una volta dimostrata la natura di transconiuganti, i ceppi in esame sono stati analizzati in dettaglio per le loro caratteristiche fenotipiche e genotipiche.

La successiva Tabella 11 riporta i risultati dell'incrocio tra il donatore Kpn3 e i diversi ceppi riceventi di *E. coli*.

Ceppo	CFU/ml	Frequenza (D)	Frequenza (R)
Kpn3	$1,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
<i>E. coli</i> 506959 CipR	$9,0 \cdot 10^8$		
Kpn3	$2,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-7}$
<i>E. coli</i> J53 AzR	$4,0 \cdot 10^8$		
Kpn3	$1,1 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ColR	$1,0 \cdot 10^8$		

Tabella 11. Risultati incrocio interspecifico con Kpn3

Analogamente a quanto osservato prima, anche in questi esperimenti di coniugazione si sono osservate delle differenze nella crescita su filtro tra donatore e ceppi riceventi.

Nel tempo di 4 ore della procedura *K. pneumoniae* 3 ha un tempo di replicazione ridotto rispetto ai ceppi di *E. coli*.

La conta dei transconiuganti ottenuti e le frequenze di trasferimento in funzione del ricevente mostrano, nuovamente, delle differenze significative se calcolate in funzione del ricevente. L'incrocio con maggiore efficienza si ottiene con il ricevente *E. coli* 506959 ($F = 2,5 \times 10^{-3}$).

Anche in questo caso sono state selezionate in modo casuale delle cellule cresciute nella piastra di selezione per i transconiuganti ed analizzate con le stesse modalità riportate per ECC11.

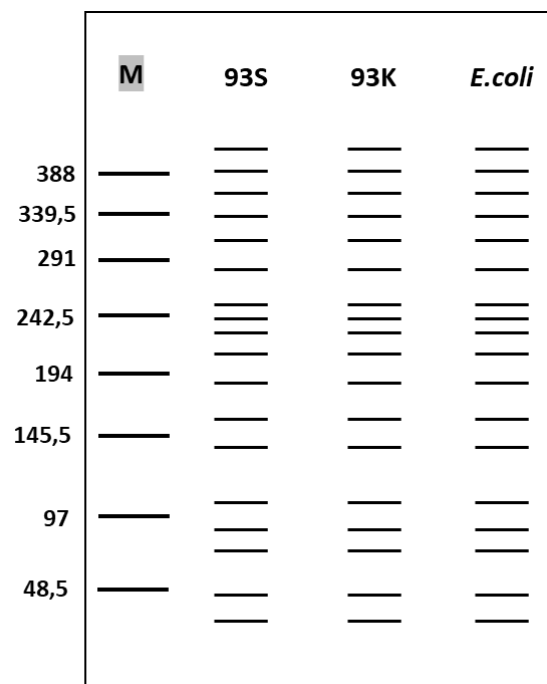


Figura 6. Profilo di restrizione XbaI-PFGE dei transconiuganti TC-93S/TC-93K e del ricevente *E. coli* 506959

La dimostrazione di profili di restrizione di TC-93K e TC-93S identici al ricevente *E. coli* 506959 (Figura 6), mediante XbaI-PFGE, conferma l'ottenimento di veri transconiuganti. L'analisi mediante S1-PFGE conferma il trasferimento di un plasmide di circa 200 kb.

La seguente tabella 12 riporta i risultati ottenuti dagli esperimenti di incrocio tra i donatori ECC12 ed ECC14 con il solo ricevente *E. coli* 506959.

Ceppo	CFU/ml	Frequenza (D)	Frequenza (R)
ECC12	$1,6 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
<i>E. coli</i> 506959	$2,0 \cdot 10^9$		
ECC14	$1,1 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$
<i>E. coli</i> 506959	$6,0 \cdot 10^9$		

Tabella 12. Risultati incroci con ECC12 e ECC14

Dati i precedenti risultati, che hanno evidenziato le migliori condizioni sperimentali, in termini di efficienza di coniugazione, utilizzando il ceppo ricevente *E. coli* 506959, sono stati condotti ulteriori esperimenti per verificare il trasferimento del plasmide IncA (contenente il gene *blaVIM*), da altri due donatori, ECC12 e ECC14. In entrambi gli incroci non si sono osservate differenze in termini di crescita e competizione su filtro così come nelle frequenze di coniugazione, che risultano alte. Le consuete analisi condotte su alcune cellule cresciute nelle piastre di selezione non hanno confermato la presenza di transconiuganti, bensì hanno evidenziato trattarsi di mutanti resistenti alla Ciprofloxacina. I valori riportati in Tabella 12 indicano pertanto delle frequenze di mutazione. Come già osservato con i due donatori del gruppo 1, anche in questo caso la comparsa di mutanti resistenti potrebbe essere legata ad una maggiore espressione del gene *qnrA1*, contenuto nel plasmide IncA di entrambi i donatori. Al fine di evitare questo fenomeno e verificare la trasmissione effettiva di IncA, sono state eseguite successive prove di coniugazione aumentando la concentrazione della Ciprofloxacina a 10 µg/ml. In queste condizioni di selezione, non sono stati ottenuti né transconiuganti né mutanti resistenti. Da questi esperimenti si possono fare due osservazioni: (1) la concentrazione più alta di Ciprofloxacina riduce od esclude la crescita di mutanti resistenti e (2) il plasmide IncA di questi donatori non sembra essere trasferibile per coniugazione, probabilmente per difetti genetici del plasmide stesso.

3.2.1 Analisi dei transconiuganti

Sono stati studiati in dettaglio:

- il transconiugante (TC-TRA) ottenuto della coniugazione tra ECC11 ed *E. coli* 506959
- il transconiugante (TC-93K) ottenuto della coniugazione tra Kpn3 ed *E. coli* 506959

3.2.2 Sensibilità agli antibiotici e attività carbapenemica

Le analisi fenotipiche di diffusione in agar, microdiluzione e mCIM dimostrano che la resistenza ai carbapenemi si esprime nei transconiuganti in seguito all'acquisizione del plasmide IncA che porta il gene *blaVIM-1*.

I valori di MIC ad Imipenem (IMI), Meropenem (MER) ed Ertapenem (ETP) sono sovrapponibili a quelli dei rispettivi donatori (Tabella 13).

Gli alti livelli di resistenza alla Ciprofloxacina confermano, anche dal punto di vista fenotipico, la natura di transconiuganti dei ceppi selezionati. Difatti i ceppi donatori sono entrambi sensibili alla Ciprofloxacina (MIC 0,03 µg/ml), mentre l'alta resistenza del ceppo ricevente *E. coli* 506959 (MIC >16 µg/ml) è dovuta a mutazioni cromosomiche di geni *housekeeping*, che codificano per gli enzimi topoisomerasi bersaglio dell'antibiotico. La resistenza all'Aztreonam non è discriminante, dato che la MIC è uniformemente elevata (ATM, > 16 µg/ml) per donatori, ricevente e transconiuganti. Tuttavia, è un dato interessante poiché potrebbe dipendere sia da fattori di resistenza del ricevente, sia da determinanti di resistenza portati dal plasmide IncA del donatore; difatti la carbapenemasi VIM conferisce resistenza a quasi tutti i β-lattamici ma non ha un'azione idrolitica diretta nei confronti del substrato ATM.

I risultati ottenuti sono stati interpretati in accordo con i valori di breakpoint dell'EUCAST¹⁵. Il test mCIM positivo indica la produzione di un'attività carbapenemasi¹⁶.

Ceppo	mCIM	MIC				
		IMI	MER	ETP	ATM	CIP
ECC11 (D)	POS (Ø 6)	4 (NS)	16 (R)	1 (R)	>16 (R)	0,03 (S)
Kpn3 (D)	POS (Ø 6)	>16 (R)	16 (R)	>16 (R)	>16 (R)	0,03 (S)
<i>E. coli</i> 506959 (R)	negativo	0,12 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	>16 (R)	>16 (R)
TC-TRA	POS (Ø 6)	8 (R)	16 (R)	0,5 (S)	>16 (R)	>16 (R)
TC-93K	POS (Ø 6)	8 (R)	8 (NS)	8 (R)	>16 (R)	>16 (R)
	Breakpoint EUCAST	S ≤ 2; R > 4	S ≤ 2; R > 8	S ≤ 0.5; R > 0.5	S ≤ 1; R > 4	S ≤ 0.25; R > 0.5

Legenda: “(R) Resistente”, “(NS) Non sensibile”, “(S) Sensibile”

Tabella 13. Risultati MIC dei ceppi in esame

3.2.3 Saggi di amplificazione

La presenza del gene *blaVIM-1* e del plasmide IncA nei transconjuganti è stata valutata mediante PCR, utilizzando i primer di letteratura¹⁷⁻¹⁸. I risultati sono riassunti in Tabella 14 e Figura 7.

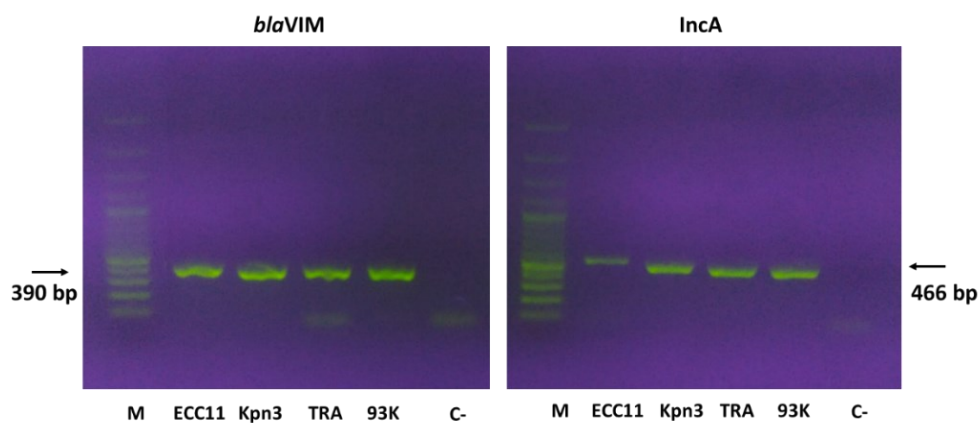


Figura 7. Elettroforesi dei prodotti di PCR (geni *blaVIM* e *rep_IncA*)

Ceppo	VIM	IncA
ECC11 (D)	+	+
Kpn3 (D)	+	+
<i>E. coli</i> 506959 (R)	-	-
TC-TRA	+	+
TC-93K	+	+

Tabella 14. Risultati analisi PCR

3.2.4 Sequenziamento Nanopore MinION

Infine, i due transconiuganti TC-TRA e TC-93K sono stati sequenziati attraverso la tecnologia Nanopore. Le sequenze assemblate sono state analizzate utilizzando i software MLST, PlasmidFinder, ResFinder disponibili online dal sito Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

Entrambi i transconiuganti hanno un contig di ca. 200 kb, corrispondente al plasmide di gruppo IncA, addizionale rispetto ai plasmidi residenti del ceppo ricevente *E. coli* 506959 (Tabella 5).

La figura 8 sottostante illustra la mappa fisica del plasmide IncA, la cui organizzazione è identica in entrambi i transconiuganti e nei rispettivi donatori, ECC11 e Kpn3.

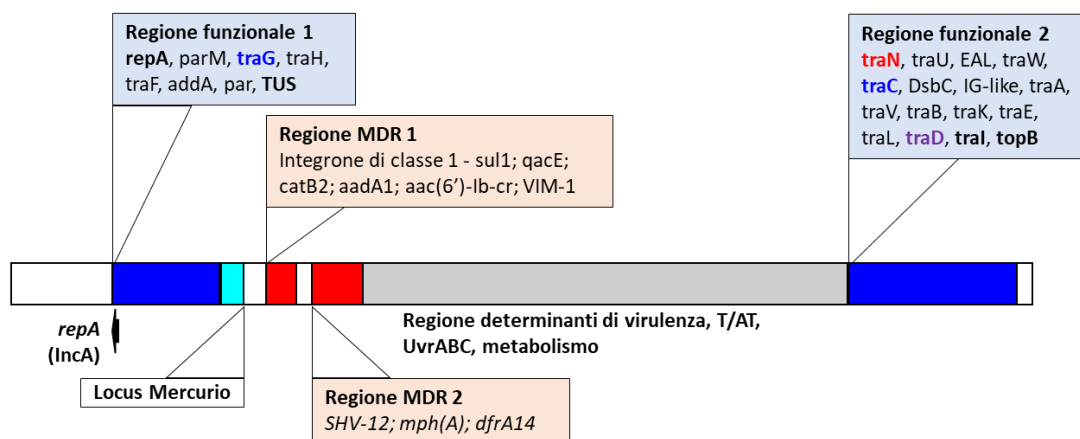


Figura 8. Mappa fisica del plasmide IncA di donatori e transconiuganti

I geni di resistenza sono distribuiti in due regioni contigue (MDR1 e MDR2, figura 8). La regione MDR1 corrisponde all'integrone di classe 1, contenente il gene *blaVIM-1*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA1*, *catB2*, *qacE* e *sul1*. La regione MDR2 contiene i geni *blaSHV-12*, che codifica per una beta-lattamasi a spettro esteso, *mph(A)* e *dfrA14* che codificano rispettivamente per la resistenza agli antibiotici macrolidi e trimetoprim. È presente anche un cluster di geni per la resistenza al mercurio. Le regioni funzionali (RF) del plasmide sono mappate in due siti non contigui di IncA. La RF1 contiene tra l'altro i geni per la replicazione e la ripartizione del plasmide (*repA*, *par*).

La RF2 contiene i restanti geni *tra* necessari per la coniugazione ed il gene *topB* che codifica per la DNA polimerasi, tra cui il gene *traI* che codifica per la relaxasi, *traD* che codifica per la proteina di accoppiamento T4CP e *traN* che codifica fattori coinvolti nella stabilizzazione del pilo di coniugazione.

La regione intermedia di oltre 40 kb contiene geni coinvolti nella virulenza, nell'adattamento metabolico e nella sopravvivenza.

Oltre a confermare l'autotrasmissibilità del plasmide IncA negli esperimenti interspecifici di coniugazione, è interessante sottolineare che il plasmide risulta avere la stessa organizzazione ed una identità nucleotidica >99% nei due ceppi donatori che appartengono a specie diverse, *E. cloacae* complex e *K. pneumoniae*.

Questi risultati sembrano suggerire che sia avvenuta una diffusione del plasmide di resistenza IncA a specie cliniche distinte, tra pazienti diversi o ambienti diversi.

4. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Tra i meccanismi di trasferimento genico orizzontale la coniugazione è uno dei più potenti nel favorire la rapida diffusione della resistenza agli antibiotici tra microrganismi diversi. I risultati di questo studio hanno permesso di valutare il ruolo delle cellule donatrici e riceventi e i fattori che possono influenzare l'efficienza del processo. È riconosciuto che il donatore rappresenta l'elemento chiave alla base della coniugazione, che per poter avvenire richiede l'espressione di specifici geni di trasferimento (geni *tra*), solitamente organizzati in cluster funzionali all'interno dei plasmidi, come indicato in precedenza ⁷. Dai dati di sequenza dei genomi dei ceppi del gruppo 1 è emerso che, pur avendo un elemento coniugativo IncN, contenente *bla*VIM-1 e diversi altri geni di resistenza agli antibiotici, tale plasmide risulta privo di una quota consistente di geni *tra* e pertanto non consente la formazione di un T4SS completo e funzionale.

La stessa analisi è stata condotta sulle sequenze dei ceppi ECC12 e ECC14 per studiare l'assenza di transconiuganti. Anche i plasmidi di gruppo IncA contenuti nei due ceppi presentano dei difetti a livello delle regioni funzionali preposte al trasferimento. Specificatamente, il plasmide IncA di ECC12 (ST286), pur avendo entrambe le RF1 e RF2 integre (Figura 8) ha il gene *traN* diviso in due parti per la presenza di una sequenza d'inserzione *ISSen4* (IS3-like) come mostrato in Figura 9. Analoga conclusione è stata riportata in un precedente lavoro per il plasmide pIB2020_IncA (165,722 bp) identificato in un ceppo di *E. kobei* (ST54) ¹⁰. Il gene *traN* codifica per una proteina essenziale, collocata nel complesso esterno del T4SS, coinvolta nella stabilizzazione del *mating pair* con la cellula ricevente ⁷. La mancata coniugazione del plasmide IncA di ECC14 è dovuta all'assenza dell'intera regione funzionale RF2, pur mantenendo intatta la RF1. Perciò, anche se le funzioni precoci di rilassamento e di taglio ad opera delle proteine del relaxosoma sono preservate, il plasmide non può essere fisicamente trasferito a cellule riceventi.

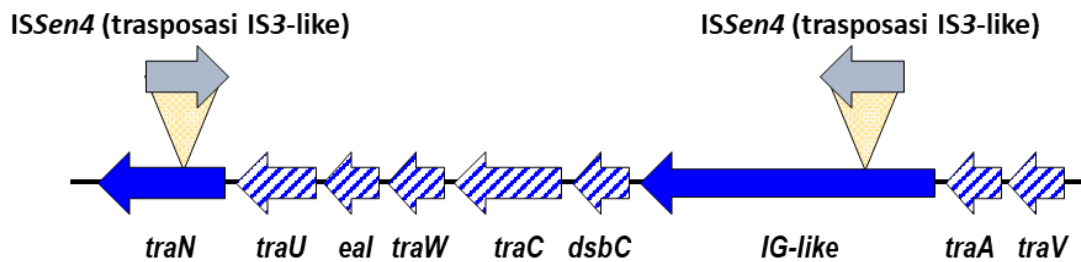


Figura 9. Mappa fisica della Regione funzionale 2 del plasmide IncA di ECC 12. È indicata l'interruzione del gene *traN* da parte della sequenza di inserzione *ISSen4*. Una seconda copia di *ISSen4* è inserita nel gene *IG-like*.

La capacità del pilo sessuale di stabilire un contatto stretto tra donatore e ricevente è considerato un primo fattore limitante nel processo di coniugazione e un determinante chiave della cosiddetta specificità d'ospite dei plasmidi. Diversi studi molecolari hanno dimostrato che alcuni fattori del complesso T4SS sono coinvolti nella specificità delle interazioni donatore-ricevente e che il ricevente stesso ha un ruolo non passivo. Simili considerazioni sono emerse anche dai nostri risultati; infatti, ECC11 e Kpn3, nonostante abbiano le caratteristiche idonee per coniugare ed avendo geneticamente le regioni di trasferimento integre, hanno prodotto transconiuganti con frequenze di coniugazione diverse a seconda dei riceventi utilizzati. Possiamo inoltre vedere come d'altro canto il ceppo di *E. coli* 506959 ha dato gli stessi risultati in termini di efficienza, nonostante il processo sia avvenuto con donatori differenti. Questo fenomeno potrebbe derivare dal fatto che la proteina TraN coopera con diversi recettori nei riceventi per mediare la stabilizzazione del pilo di accoppiamento e l'efficienza del trasferimento del DNA.

Studi di coniugazione sul prototipo del plasmide IncF ed analisi di mutanti di riceventi di *E. coli* hanno permesso di identificare la proteina maggiore OmpA della membrana esterna e il lipopolisaccaride (LPS) come i fattori più importanti coinvolti nell'interazione con il pilo sessuale del donatore. La proteina TraN, in particolare, componente del T4SS del donatore, riconosce e crea la connessione stabile con i componenti OmpA e LPS del ricevente⁷. Modificazioni nel ricevente di questi fattori possono influire sull'efficienza di coniugazione.

Studi recenti hanno dimostrato che anche l'efficienza di coniugazione dei plasmidi pkpQIL, che sono alla base della disseminazione del clone pandemico multiresistente *K. pneumoniae* ST258, è legata a specifiche interazioni tra donatore e ricevente²¹.

I plasmidi pkpQIL appartengono al gruppo IncFIIk ed esprimono un meccanismo di coniugazione simile a quello trovato per il plasmide F. Utilizzando un sistema reporter pkpGFP che esprime una proteina fluorescente, gli autori dello studio hanno potuto quantificare la frequenza di coniugazione negli incroci tra ceppi donatori appartenenti a ST258 in specie diverse di riceventi ed evidenziando il coinvolgimento specifico di un'altra porina della membrana esterna, OmpK36 (omologa di OmpF in *E. coli*) nell'interazione con TraN del donatore. Combinando diversi lavori di ricerca con analisi bioinformatiche è stato possibile definire uno schema di classificazione delle proteine TraN in base alle interazioni con fattori del ricevente in 4 categorie, a seconda del plasmide del donatore e della specie ricevente ²¹. Secondo questa classificazione, al momento, sono stati identificati quattro modelli di interazione tra TraN del donatore e proteine del ricevente.

Anche nel nostro studio possiamo ipotizzare che le diverse frequenze di coniugazione ottenute usando i donatori *E. cloacae* complex 11 e *K. pneumoniae* 3 ed i tre diversi riceventi di *E. coli* potrebbero dipendere da differenze nei componenti della membrana esterna dei riceventi, che appartengono a ST diversi (ST10, ST73 e ST131), oppure ad una migliore combinazione tra la proteina TraN del plasmide IncA del donatore e proteine del ricevente. Una combinazione più efficace potrebbe essere il motivo della maggiore efficienza dimostrata con *E. coli* 506959 che appartiene al clone pandemico internazionale ST131, in cui circolano diversi tipi di plasmidi ad alto rischio, come i pkpQIL.

4.1 Conclusioni

Questo studio ci ha permesso di analizzare come, attraverso l'acquisizione e l'espressione di geni trasportati da plasmidi auto trasmissibili, la resistenza ai carbapenemi si può diffondere tra ceppi appartenenti a differenti specie. Diversi fattori possono influenzare il processo di trasferimento orizzontale. Un primo aspetto da considerare è la grande diversità mostrata dai plasmidi in termini di spettro d'ospite ed efficienza di coniugazione, ma altrettanto importanti sono le interazioni tra componenti specifici dei partner cellulari. La stabilizzazione del pilo coniugativo è determinata sia da alcune proteine prodotte dal donatore sia da altre che sono espresse nel ricevente.

Difatti da quanto emerso nel nostro studio il fatto di avere il gene *traN* non funzionale, a causa di una sequenza d'inserzione, è sufficiente per inibire il processo di coniugazione. Viceversa, l'alta efficienza di coniugazione evidenziata con uno dei tre riceventi potrebbe derivare dall'instaurarsi di una combinazione efficace tra TraN del plasmide IncA dei nostri ceppi e un recettore proteico di *E. coli*, analogamente a quella riportata in letteratura tra TraN dei plasmidi di gruppo IncF e la porina OmpK36 in *K. pneumoniae*.

5. BIBLIOGRAFIA

1- Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(4). doi:10.1128/CMR.00002-19

2- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>

3. Eichenberger EM, Thaden JT: Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8(2):37. doi: 10.3390/antibiotics8020037.

4. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18

5. Rossi F., Cuomo V., Riccardi C. *Farmacologia per Le Professioni Sanitarie*.

6. Frost LS, Leplae R., Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):722-32. doi:10.1038/nrmicro1235.

7. Chloé Virolle, Kelly Goldlust, Sarah Djermoun, Sarah Bigot and Christian Lesterlin. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes (Basel)* 2020 Oct 22;11(11):1239. doi: 10.3390/genes11111239.

8- Emeraud C, Petit C, Gauthier L, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. Emergence of VIM-producing Enterobacter cloacae complex in France between 2015 and 2018. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 77, Issue 4, April 2022, Pages 944–951, <https://doi.org/10.1093/jac/dkab471>

9- Arcari G, Di Lella FM, Bibbolino G, Mengoni F, Beccaccioli M, Antonelli G, Faino L, Carattoli A. 2020. A multispecies cluster of VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacterales linked by a novel, highly conjugative, and broad-host-range IncA plasmid forebodes the reemergence of VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02435-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02435-19>.

10- Marchetti, V.M.; Bitar, I.; Sarti, M.; Fogato, E.; Scaltriti, E.; Bracchi, C.; Hrabak, J.; Pongolini, S.; Migliavacca, R. Genomic Characterization of VIM and MCR Co-Producers: The First Two Clinical Cases, in Italy. *Diagnostics* **2021**, *11*, 79. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010079>

11 - Matsumura Y, Peirano G, Pitout JDD. 2018. Complete genome sequence of *Escherichia coli* J53, an azide-resistant laboratory strain used for conjugation experiments. *Genome Announc* 6:e00433-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00433-18>.

12 - Minogue TD, Daligault HA, Davenport KW et al., 2014. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announc*. 2(5):e00969-14. doi:10.1128/genomeA.00969-14.

13 - Carelli, M.; Griggio, F.; Mingoia, M.; Garofalo, C.; Milanovi'c, V.; Pozzato, N.; Leoni, F.; Veschetti, L.; Malerba, G.; Sandri, A.; et al. Detecting Carbapenemases in Animal and Food Samples by Droplet Digital PCR. *Antibiotics* 2022, *11*, 1696. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121696>

14 - <https://eucast.org>.

15-

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables_v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf (eucast.org)

16 - Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2321– 2333 (2017).

17 - Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.

18 - Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing *Journal of Microbiological Methods* 63 (2005) 219- 228

19 - Golding GR, Campbell J, Spreitzer D, Chui L. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus*. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1301. doi:10.1007/978-1-4939-2599-5_8

20- Tenover FC, Arbeit RD, Goering R v, et al. GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Vol 33.; 1995.

21- Low WW, Wong JLC, Beltran LC, Seddon C, David S, Kwong HS, Bizeau T, Wang F, Peña A, Costa TRD, Pham B, Chen M, Egelman EH, Beis K, Frankel G. Mating pair stabilization mediates bacterial conjugation species specificity. *Nat Microbiol.* 2022 Jul;7(7):1016-1027. doi: 10.1038/s41564-022-01146-4.