



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Corso di Laurea
TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO**

**Ricerca e caratterizzazione
di enterobatteri produttori di carbapenemasi
in campioni clinici fecali**

Tesi di laurea di:
Federica Lazzari

Relatore:
Dott.ssa Marina Mingoia

Correlatore:
Dott.ssa Gloria Magi

Anno Accademico 2018-2019

Indice

1. INTRODUZIONE	2
1.1. Le β -lattamasi. Generalità e classificazione.....	6
1.2. Scopo della ricerca	11
2. MATERIALI E METODI	13
2.1. Terreni di coltura e principali sostanze chimiche utilizzate.....	13
2.2. Protocollo di screening per isolamento e identificazione di CPE	16
2.2.1. Identificazione presuntiva di specie	17
2.3. Determinazione della sensibilità agli antibiotici	19
2.3.1. Antibiogramma	19
2.3.2. Minima concentrazione inibente (MIC)	20
2.4. Metodi fenotipici per determinare la produzione di ESBL e carbapenemasi.....	22
2.4.1. Double-Disc Synergy Test (DDST)	22
2.4.2. Test di Hodge modificato (MHT).....	23
2.4.3. Modified Carbapenem Inactivation method (mCIM).....	25
2.5. Procedure per l'analisi genotipica	26
2.5.1. Estrazione DNA genomico	26
2.5.2. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	28
2.5.3. Elettroforesi in gel di agarosio.....	33
3. RISULTATI	35
3.1. Determinazione della sensibilità agli antibiotici	36
3.2. Metodi fenotipici per determinare la produzione di ESBL e carbapenemasi	38
3.3. Analisi genotipica.....	40
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	43
4.1. Conclusioni	44
5. BIBLIOGRAFIA	46

Introduzione

La resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta un problema di grande attualità e notevole rilevanza per la medicina moderna, in quanto minaccia la sostenibilità di una risposta sanitaria pubblica globale ed efficace contro le malattie infettive ([WHO, 2015](#)). L'AMR ha un profondo impatto epidemiologico, a causa dell'aumento della morbosità e mortalità che si associa alle infezioni causate da batteri antibiotico-resistenti. Una delle più grandi preoccupazioni destinate da questo fenomeno è che i protocolli sanitari moderni potrebbero essere gravemente compromessi. Per fare un esempio, nella maggior parte dei casi in cui i pazienti sono sottoposti ad un intervento chirurgico, viene utilizzata una chemioterapia a scopo profilattico per ridurre il rischio di infezioni batteriche; pertanto, in un mondo in cui gli antibiotici non sono più efficaci, questa misura diventerebbe in gran parte inutile e la chirurgia diventerebbe molto più pericolosa. Allo stesso tempo, le moderne terapie contro il cancro portano ad una immunosoppressione, rendendo i pazienti più suscettibili alle infezioni, per cui la chemioterapia diventerebbe una proposta molto più rischiosa senza antibiotici efficaci per prevenire o curare l'infezione.

Secondo i dati del report O'Neill 2014 sulla AMR, un altro fattore da considerare è il costo umano ed economico legato alle infezioni da batteri resistenti, per cui se il fenomeno manterrà il trend attuale, nel 2050 si avrà da una parte, un costo stimato in termini di vite umane di circa 10 milioni/anno e, dall'altra, una grave ricaduta a livello economico, con una riduzione dal 2% al 3.5% nel prodotto interno lordo (PIL) ed un costo complessivo stimato in 100 trilioni di dollari ([O'Neill J, 2014](#)).

Nell'ambito della resistenza antimicrobica, particolare importanza riveste la diffusione globale di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE), i quali si distinguono da quelli resistenti ai carbapenemi (CRE) per il diverso

meccanismo che sta alla base della resistenza; nei ceppi CPE la resistenza è dovuta alla produzione di enzimi in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico degli antibiotici, mentre la resistenza ai carbapenemi dei CRE è dovuta ad altri meccanismi spesso in associazione tra loro tra cui (i) l'iperproduzione di β -lattamasi AmpC, (ii) la produzione di ESBL (extended-spectrum beta-lactamase), (iii) la perdita o la modificazione delle proteine della membrana esterna e (iv) la sovrapproduzione di pompe di efflusso. Anche se i ceppi CRE rappresentano delle importanti sfide terapeutiche, i ceppi CPE risultano ancora più significativi nel campo della prevenzione e della terapia delle infezioni, dal momento che i geni codificanti per le carbapenemasi sono localizzati per lo più su plasmidi che possono essere trasferiti anche a livello interspecifico (Iovleva A, 2017) per trasferimento genico orizzontale.

Dal momento che i carbapenemici sono importanti antibiotici *last-line* per la prevenzione e il trattamento delle infezioni sostenute da numerosi batteri *multidrug resistant* (MDR), nei pazienti con infezioni da CPE le opzioni terapeutiche possono essere davvero limitate, soprattutto in caso di infezioni nosocomiali. I ceppi CPE mostrano generalmente valori di MIC elevati nei confronti dei carbapenemi, ma il livello di resistenza può essere molto variabile, con valori che variano da 0.12 mg/L a oltre 256 mg/L. È stato suggerito che la monoterapia con carbapenemi può ancora essere efficace quando i valori di MIC degli isolati CPE sono bassi (Tzouvelekis LS, 2012); tuttavia, la maggior parte delle CPE ha valori di MIC superiori ai breakpoint clinici ed inoltre vi è un forte sospetto che la terapia a base di carbapenemici possa portare ad un progressivo aumento dei valori di MIC attraverso la selezione di mutazioni nei geni delle porine (Clancy CJ, 2013). In Italia il fenomeno è particolarmente preoccupante per il costante e inarrestabile aumento dal 2010 di isolati clinici resistenti ai carbapenemi.

In merito all'origine dei ceppi CPE, la *Klebsiella pneumoniae* produttrice di KPC è stata la prima specie resistente ad emergere e a diffondersi a livello globale; l'enzima era stato inizialmente segnalato da un ceppo di *K.*

pneumoniae isolato nella Carolina del Nord nel 1996 (Yigit H, 2001). L'anno successivo (1997) ceppi di *K. pneumoniae* KPC-positivi erano stati identificati in alcuni ospedali di New York City (Bradford PA, 2004). La rapida diffusione di questi ceppi era confermata da un successivo studio di sorveglianza condotto in tutta la città, dove la percentuale di isolati clinici di *K. pneumoniae* produttore di KPC aveva raggiunto il 38% (Bratu S, 2005).

Negli Stati Uniti la diffusione di questi ceppi è aumentata, ma non in modo uniforme, dato che le regioni orientali hanno mostrato una prevalenza maggiore rispetto alle regioni occidentali e meridionali; in particolare, le zone a più alta endemia sono state le regioni del Medio Atlantico e del Midwest, la Florida e Porto Rico. La prevalenza complessiva della resistenza ai carbapenemici tra gli isolati di *Klebsiella* spp. responsabili di infezioni nosocomiali acquisite negli ospedali statunitensi è stata circa del 12% tra il 2009 e il 2010, secondo i dati della National Healthcare Safety Network (Gupta N, 2011).

La prima segnalazione di un focolaio epidemico al di fuori degli Stati Uniti di *K. pneumoniae* KPC-produttore si è avuta dapprima in Israele (Samra Z, 2007) e successivamente in Grecia (Maltezou HC, 2009) e in Italia (Giani T, 2009). La rapida diffusione globale di *K. pneumoniae* KPC+ è ora intesa come un fenomeno ampiamente clonale (Woodford N, 2011).

Il problema dei ceppi CPE si è recentemente acuito in seguito alla dimostrazione di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di altre carbapenemasi, come NDM e OXA-48, che hanno cominciato a diffondersi rispettivamente dall'Asia meridionale e dal Nord Africa.

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 ferita infetta, prima di tornare in Svezia all'inizio del 2008 (Yong D, 2009). Ceppi CPE NDM-produttori erano presenti in ospedali indiani già nel 2006 (Castanheira M, 2011); in uno studio del 2010 si evidenziava una prevalenza del 5.2% di isolati

NDM-positivi in tre ospedali indiani (Castanheira M, 2013), mentre in Pakistan, nello stesso anno, il 18.5% dei campioni di feci di pazienti da due ospedali era positivo per la presenza di CPE NDM-produttori (Day KM, 2013). 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.

Per quanto riguarda le *Enterobacteriaceae* produttrici di OXA-48, l'enzima è stato trovato per la prima volta in un ceppo di *K. pneumoniae* isolato in Turchia nel 2001 (Poirel L, 2004). Ceppi di *K. pneumoniae* co-produttori di OXA-48 ed ESBL sono stati segnalati principalmente in Turchia, in Nord Africa, nei paesi del Golfo Persico (Arabia Saudita, Emirati Arabi Uniti, Kuwait, Qatar, Oman e Bahrein) e in India (Poirel L, 2012; Zowawi HM, 2013); diversi focolai si sono verificati anche in Europa, mentre gli isolati rimangono estremamente rari negli Stati Uniti, nonostante siano stati segnalati casi da importazione (Mathers AJ, 2013).

Il centro di sorveglianza delle infezioni nosocomiali degli Stati Uniti ha riportato un drastico aumento di CPE soprattutto negli ultimi anni, passando da un valore di 2.1% di CPE nel 2001 a 4.2% nel 2011; per la sola specie *K. pneumoniae* il trend registrato andava da 1.6% del 2001 a 10.4% del 2011 (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Nel 2018 è stata condotta un'indagine epidemiologica multinazionale per valutare la diffusione globale di ceppi CPE in 37 Paesi europei ed analizzare la distribuzione geografica dei principali enzimi carbapenemasi (Brolund A, 2019). I risultati di questa valutazione congiunta hanno mostrato che il tasso di CPE nei sistemi sanitari europei si è ulteriormente alzato tra il 2015 e il 2018. Nel 2018, infatti, tutti e 37 i paesi partecipanti hanno segnalato casi di CPE, mentre nel 2015 tre paesi (Bosnia Erzegovina, Islanda, Kosovo) non avevano riportato isolamenti (Albiger B, 2015). Complessivamente, 11 paesi hanno riportato un aumento di CPE rispetto al 2015, 25 non hanno registrato cambiamenti rilevanti e solo in un paese

(Slovenia) è stato osservato un miglioramento della situazione epidemiologica (Brolund A, 2019). Inoltre, rispetto al 2015, in quattro paesi (Repubblica Ceca, Finlandia, Portogallo, Serbia) i ceppi CPE si sono diffusi a livello regionale o interregionale; infine, la situazione endemica di Grecia, Italia, Malta e Turchia è rimasta tale anche nel 2018.

1.1 Le β -lattamasi: generalità e classificazione

La produzione di enzimi inattivanti come le β -lattamasi rappresenta uno dei principali meccanismi di resistenza nei confronti della famiglia di farmaci antibiotici denominati β -lattamici. 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). Tutti i β -lattamici condividono il meccanismo di azione, che consiste nel blocco della sintesi della parete cellulare inibendo la reazione di transpeptidazione, coinvolta nella formazione di ponti crociati tra i polimeri di peptidoglicano, componente essenziale di queste strutture batteriche.

Un recentissimo update sulle β -lattamasi (Bush K, 2018) descrive l'emergenza e la diffusione di oltre 2000 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, la quale distingue gli enzimi in quattro classi molecolari indicate con le lettere

da A a D (Ambler RP, 1980); le classi A, C e D presentano un residuo di serina nel loro sito catalitico, mentre la classe B comprende le cosiddette metallo β -lattamasi.

- **Classe A:** comprende molte ESBL e le serina-carbapenemasi KPC. Le β -lattamasi appartenenti a questa classe conferiscono resistenza a penicilline, carbapenemici, cefalosporine e monobattami.
- **Classe B:** è costituita da metallo β -lattamasi (MBL), le quali utilizzano un cofattore enzimatico metallico (solitamente Zn^{2+}) e sono efficaci contro penicilline, cefalosporine e carbapenemici; questi enzimi non interferiscono con i monobattami e la loro azione viene inibita da chelanti metallici come l'EDTA.
- **Classe C:** è costituita dalle cefalosporinasi (es. AmpC), che agiscono contro penicilline e cefalosporine.
- **Classe D:** comprende quelle che vengono definite OXA- β -lattamasi o oxacillinasi poiché idrolizzano più efficacemente le isossazolil-penicilline. In questo gruppo sono incluse alcune carbapenemasi.

Le carbapenemasi più diffuse nei batteri Gram-negativi, gli enzimi KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP, appartengono alle classi A, B e D di Ambler.

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi)

β -lattamasi di classe A che ha la capacità di idrolizzare penicilline, cefalosporine e carbapenemi. Codificata dal gene *bla*_{KPC}, soprattutto in isolati di *K. pneumoniae*, è ampiamente diffusa in tutto il mondo ed è particolarmente presente nel bacino del Mediterraneo, considerato un'area di endemia. Nonostante la dimostrazione di numerose varianti, le più frequenti sono KPC-2 (identica dopo vari studi al primo enzima studiato KPC-1) e KPC-3. L'enzima KPC è stato scoperto nel 1996 negli USA e da

allora è la carbapenemasi più frequentemente osservata (Lee C-R, 2016). In Italia circolano entrambe le varianti KPC-3 e KPC-2.

NDM (New Delhi metallo-beta-lattamasi)

β -lattamasi di classe B in grado di idrolizzare penicilline, cefalosporine e carbapenemi, ma non l'aztreonam. È un enzima molto diverso dagli altri inclusi nella classe B di Ambler e ne esistono attualmente una decina di varianti, scoperte soprattutto in Asia. I batteri che producono NDM-1 (gene *bla_{NDM-1}*) spesso co-producono altri fattori di resistenza concomitanti, come le cefalosporinasi AmpC plasmidiche, varie ESBL, altre carbapenemasi come OXA-48, VIM e KPC o resistenze ai chinoloni e ai macrolidi per la produzione di esterasi (Yong D, 2009). Oggi NDM è considerata endemica nel subcontinente indiano, il quale comprende India, Pakistan e Bangladesh (Lee C-R, 2016).

OXA-48 (oxacillinasi-48)

È una oxacillinasi, la più efficace della classe D contro l'imipenem; è stata identificata in diverse specie MDR delle *Enterobacteriaceae*; idrolizza lentamente carbapenemi e cefalosporine a spettro esteso ed è scarsamente inibita dalla maggior parte degli inibitori delle β -lattamasi, fatta eccezione per avibactam (Sader HS, 2018). L'enzima, prodotto dal gene *bla_{OXA-48}* a codificazione plasmidica, è stato scoperto in Turchia nel 2003 in un ceppo di *K. pneumoniae* (Poirel L, 2004). Endemica in Turchia, Marocco, Libia, Egitto, Tunisia e India, l'OXA-48 si riscontra sporadicamente anche in alcuni paesi europei, in particolare Spagna e Francia (Nordmann P, Poirel L, 2014).

VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lattamasi)

Identificata per la prima volta a Verona nel 1997 in *Pseudomonas aeruginosa* (Lauretti L, 1999), è stata successivamente segnalata anche negli Enterobatteri. La variante VIM-2 era stata identificata nello stesso

periodo in Francia, sempre in un ceppo di *P. aeruginosa*. Il gene *bla_{VIM}* è localizzato su elementi denominati integroni. L'enzima VIM-1 è considerato endemico nel sud Europa (Italia, Grecia e Spagna), in Corea del Sud e in Taiwan (Nordmann P, Poirel L, 2014).

IMP (active on imipenem)

Questo enzima rappresenta la prima MBL acquisita identificata in diverse specie Gram-negative clinicamente importanti. La prima dimostrazione di IMP-1 è avvenuta in Giappone in un isolato di *Serratia marcescens* nel 1991 (Ito H, 1995). Le numerose varianti studiate di IMP, tutte prodotte da *bla_{IMP}*, sono in grado di idrolizzare imipenem, cefalosporine e penicilline. La più ampia diffusione di enzimi di tipo IMP è stata dimostrata principalmente in Giappone, Taiwan e Cina orientale, sebbene vi siano state singole segnalazioni in molti altri paesi; inoltre, gli isolati che producono questo tipo di β -lattamasi hanno talvolta causato focolai nosocomiali (Nordmann P, Poirel L, 2014).

Le ESBL sono le più importanti β -lattamasi in grado di conferire resistenza alle cefalosporine di 2^a e 3^a generazione; esse includono TEM, SHV, CTX-M e tutte ricadono nella classe A di Ambler.

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. Sono note oltre 100 varianti di questo enzima, ma le ESBL di tipo TEM si sono evolute a partire da mutazioni nei geni codificanti per TEM-1 e TEM-2 (che non sono ESBL) mediante sostituzione di uno o più residui di aminoacidi in prossimità del sito attivo. TEM è stata identificata per la prima volta ad Atene, in Grecia, nel 1965, dopo aver isolato un ceppo di *E. coli* da un paziente chiamato Temoneira (da qui il nome TEM). TEM-1 è in

grado di idrolizzare la penicillina e le cefalosporine di prima generazione come la cefaloridina.

SHV

Il primo gene *bla*_{SHV-1} fu identificato negli anni '70 in *E. coli* (Bush K, 2018). Ad oggi sono state descritte numerose varianti SHV, alcune attive verso le cefalosporine di terza generazione (Tzouveleki LS, 1999) i monobattami e i carbapenemi (Poirel L, 2003); diciassette varianti sono state identificate in isolati clinici di *K. pneumoniae* clinica e sono state descritte in tutto il mondo (Brasile, Portogallo, Algeria, Stati Uniti d'America, Tunisia, Paesi Bassi, Francia, Sud Africa, Colombia e Cina).

CTX-M

Gruppo di β -lattamasi a spettro esteso più importante a livello clinico e diffuso in tutto il mondo. Questi enzimi presentano spiccata attività idrolitica nei confronti degli antibiotici cefotaxime (da qui il nome CTX-M) e ceftriaxone, oltre che una maggiore sensibilità al tazobactam rispetto al clavulanato; sono strettamente correlati alle β -lattamasi cromosomiche del genere *Kluyvera* (Decousser JW, 2001; Poirel L, 2002). Gli enzimi CTX-M sono stati trovati in almeno 26 specie batteriche, in particolare in *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Sebbene le varianti dominanti di CTX-M siano geograficamente diverse, CTX-M-15 e CTX-M-14 sono quelle più comuni rilevate in tutto il mondo in agenti patogeni clinicamente importanti.

1.2 Scopo della ricerca

La rapida diffusione di microrganismi multiresistenti rappresenta un rilevante problema mondiale con ricadute importanti sulla salute pubblica. E' stato stimato che la resistenza agli antibiotici causa nel mondo circa 700.000 decessi annui ma è stato altresì stimato che se il tasso di resistenza manterrà lo stesso incremento osservato negli ultimi anni, nel 2050 il costo in termini di morti a causa di infezioni sostenute da batteri antibiotico-resistenti potrebbe arrivare a 10 milioni (O'Neill J, 2014).

Tra i patogeni antibiotico-resistenti che sono motivo di attenzione e preoccupazione a livello globale (WHO, 2017), il gruppo con livello di priorità 1 è rappresentato dai batteri CPE, ossia ceppi di enterobatteri produttori di carbapenemasi in grado di conferire la resistenza ai carbapenemi, antibiotici che rappresentano l'ultima risorsa terapeutica per le infezioni causate da batteri Gram-negativi multi-resistenti. Le infezioni da CPE, in particolare le batteriemie, hanno un tasso di mortalità elevato (Tumbarello M, 2015), soprattutto per la limitata disponibilità terapeutica che obbliga all'uso di antibiotici meno efficaci e/o maggiormente tossici o a combinazioni di farmaci.

Secondo i dati del Report 2015 della sorveglianza europea dell'antibiotico-resistenza EARSNet, coordinata dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), l'Italia detiene, insieme alla Grecia, alte percentuali di isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi, con valori molto superiori alla media europea. Nello studio EuSCAPE (*European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*), finanziato dall'ECDC con lo scopo di migliorare la sorveglianza di CPE in Europa, l'Italia è considerata un paese con endemia da CPE già dal 2011 (Giani T, 2013). Nell'ottica di quanto riportato, l'attuazione di programmi di sorveglianza attiva finalizzati a prevenire la diffusione dei ceppi CPE rappresenta ormai una necessità anche nel nostro Paese.

Scopo di questa tesi è stato quello di valutare la prevalenza di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi e la distribuzione delle varie specie, mediante uno screening di campioni di feci ottenuti da pazienti ammessi all'ospedale regionale di Torrette. Lo studio ha inoltre preso in considerazione il resistoma dei ceppi identificati (sensibilità agli antibiotici; co-resistenze; prevalenza di CRE, CPE, MDR), il tipo e la distribuzione dei principali geni di carbapenemasi e di altri geni *bla*, attraverso procedure per l'analisi genotipica.

Materiali e metodi

2.1 Terreni di coltura e principali sostanze chimiche utilizzate

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

Agar MacConkey (MC): terreno di coltura differenziale e selettivo per i batteri Gram-negativi. Gli agenti selettivi in grado di inibire la crescita dei batteri Gram-positivi sono i sali biliari e il cristalvioletto (inibisce la crescita dei Gram-positivi capaci di sopportare la presenza dei sali biliari, come ad esempio gli enterococchi). In questo caso il lattosio rappresenta l'unica fonte di carbonio e la sua fermentazione è resa visibile da un indicatore di pH (rosso neutro); in particolare, i batteri lattosio-fermentanti (es. *Escherichia coli*) formano colonie rosse con un'area circostante di precipitazione dei sali biliari, mentre i batteri lattosio-non fermentanti (es. *Proteus mirabilis*) danno origine a colonie incolori o trasparenti (Figura 1).



Figura 1. Agar MacConkey. A destra colonie lattosio-non fermentanti, a sinistra colonie lattosio-fermentanti.

Tryptic Soy Agar (TSA): terreno di coltura non selettivo utilizzato per la crescita di batteri che non presentano requisiti nutrizionali specifici. Contiene peptone di caseina e peptone di soia che forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, minerali, vitamine ed altri nutrienti utili a supportare la crescita dei microrganismi. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. Di questo terreno esiste la variante liquida (Tryptic Soy Broth) (TSB).

Brain Heart Infusion Agar (BHA): terreno di coltura nutritivo, non selettivo, d'uso generale, utilizzato in microbiologia per la coltivazione e il mantenimento di microrganismi più esigenti. Viene realizzato a partire da elementi biologici ottenuti bollendo parti di cuore e cervello di origine bovina o suina; di solito contiene cloruro di sodio, glucosio e sodio fosfato bifasico. Di questo terreno esiste anche la variante liquida (Brain Heart Infusion Broth) (BHB).

Mueller Hinton Agar (MHA): terreno di coltura non selettivo, né differenziale, utilizzato principalmente per eseguire test di sensibilità agli antibiotici, attraverso il 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 per test di sensibilità di batteri aerobi e anaerobi a crescita rapida isolati da campioni clinici, mediante metodi di diluizione in brodo. È formulato per avere un basso contenuto di timina e timidina.

Chromatic CRE Agar: terreno cromogenico utilizzato per la ricerca di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi direttamente da campioni clinici (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi TE). Contiene una miscela di peptoni che rappresenta una fonte di aminoacidi, azoto, minerali, vitamine ed altri fattori che aumentano la crescita dei batteri. Le miscele cromogene e selettive facilitano l'identificazione dei batteri sulla base del colore e della morfologia, inibendo la maggior parte dei microrganismi non appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*; al termine dell'incubazione si osserva l'aspetto delle colonie e si interpretano i risultati come indicato nella tabella 1.

MICROORGANISMO	ASPETTO TIPICO DELLE COLONIE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente ai carbapenemi	Blu-viola
<i>Escherichia coli</i> resistente ai carbapenemi	Rosso
<i>Enterobacter</i> spp. resistente ai carbapenemi	Blu-verde
<i>Citrobacter</i> spp. resistente ai carbapenemi	Blu con alone rosso
Non <i>Enterobacteriaceae</i> resistenti ai carbapenemi	Biancastro
Altri microrganismi resistenti ai carbapenemi	Inibiti

Tabella 1. Ceppi batterici e relativo aspetto su Chromatic CRE.

Brilliance CRE Agar: terreno cromogenico di screening per la rilevazione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (Oxoid, Garbagnate, MI). Fornisce l'identificazione cromogenica presuntiva di *E. coli* e del gruppo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (KESC) resistenti ai carbapenemi, direttamente da campioni clinici, in 18 ore. Il sistema distingue *E. coli*, il quale cresce formando colonie di 1-2 mm di colore rosa pallido, dagli organismi del gruppo KESC, che invece danno

origine a colonie blu. In questo terreno possono crescere anche altri organismi resistenti ai carbapenemi non appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, come ad esempio *Acinetobacter baumannii* (colonie di 1-2 mm di colore variabile da trasparente a crema).

BH + Glicerolo: terreno di mantenimento per la conservazione a lungo termine dei campioni e per tutte le analisi successive. Le colture pure vengono sospese in brodo BH con l'aggiunta del 20% di glicerolo 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 g
EDTA 0.5 M pH 8	100 ml
Acido Acetico Glaciale	57.1 ml
H ₂ O bidistillata	fino a 1 litro

2.2 Protocollo di screening per isolamento e identificazione di CPE

Da Novembre 2018 a Maggio 2019 sono stati raccolti campioni di feci e tamponi rettali; i primi sono stati ottenuti dai laboratori di Microbiologia e del servizio di Virologia dell'ospedale regionale di Torrette, mentre i secondi sono stati ottenuti da pazienti ammessi alla Clinica di Malattie Infettive.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad uno screening qualitativo che prevede un primo arricchimento selettivo in brodo (TSB) contenente l'antibiotico Ertapenem (ETP) ad una concentrazione di 0.125 µg/ml, seguito dall'incubazione per una notte a 37°C; aliquote di 0.1 ml delle brodocolture positive sono state poi seminate in modo uniforme in terreno selettivo MC supplementato con ETP (0.125 µg/ml). Per l'identificazione presuntiva di specie dei ceppi cresciuti in piastra sono stati effettuati il test dell'ossidasi e dei test multipli biochimici, in particolare la galleria API 20 E (Biomerieux) e l'Enterosystem 24R (Liofilchem).

Tutte le colonie cresciute in terreno selettivo, sospette per la resistenza ai carbapenemici, sono state quindi sottoposte ad analisi di sensibilità agli antibiotici utilizzando la procedura standard di diffusione in agar (EUCAST). In base ai risultati dell'antibiogramma, è stato estratto il DNA genomico degli isolati per la ricerca, mediante amplificazione genica, dei principali geni di carbapenemasi (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}) e di altri geni di β-lattamasi (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, *bla*_{CMY}). In tutti gli esperimenti di amplificazione sono stati utilizzati dei controlli positivi.

2.2.1 Identificazione presuntiva di specie

Test dell'ossidasi: test rapido per la determinazione dell'enzima citocromo-ossidasi nei batteri Gram-negativi e per distinguere presuntivamente le specie appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae* che sono uniformemente ossidasi-negative. Il test consiste nel mettere a contatto su carta assorbente la colonia batterica in esame e il reattivo di Kovacs (sol. acquosa all'1% di N,N,N,N tetra-metil-p-fenilendiammina); la comparsa di una colorazione blu intenso entro 30-60'' indica che la reazione è positiva, mentre la mancata colorazione entro 30-60'' indica che la reazione è negativa.

API 20 E (bioMèrieux): sistema standardizzato per l'identificazione su base biochimica delle *Enterobacteriaceae* e di altri bacilli Gram-negativi non esigenti. La galleria è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati, le quali vengono inoculate con una sospensione batterica standardizzata. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione si traducono in viraggi di colore diretti o rivelati dall'aggiunta di reattivi specifici. In base alla Tabella di Lettura in dotazione, ogni test fornirà un risultato positivo o negativo. L'insieme dei risultati fornirà un codice che servirà per l'identificazione di specie utilizzando uno specifico software dedicato.



Figura 2. Galleria API 20 E. In alto test non seminato (tutte le reazioni sono negative), in basso un test di identificazione positiva.

Enterosystem 24R (Liofilchem): sistema a 24 pozzetti contenenti substrati biochimici essiccati per l'identificazione dei batteri Gram-negativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il sistema viene inoculato con la sospensione del microrganismo in esame ed incubato in termostato. Si valuta la variazione di colore nei vari pozzetti e la combinazione delle reazioni positive e negative determina il profilo numerico utilizzato per l'identificazione; quest'ultima si ottiene tramite l'utilizzo del software online disponibile sul sito web della ditta Liofilchem.

2.3 Determinazione della sensibilità agli antibiotici

2.3.1 Antibiogramma: sistema di valutazione qualitativo della sensibilità agli antibiotici da parte dei ceppi in esame che si ottiene mediante la procedura di diffusione in agar, secondo le direttive proposte dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ([Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015](#)). Colture pure dei ceppi in esame cresciute overnight a 37°C in terreno selettivo MC vengono sospese in brodo MHB e opportunamente diluite al fine di ottenere una densità ottica (misurata alla lunghezza d'onda di 625 nm, OD₆₂₅) di 0.1, corrispondente a circa 1×10^8 Unità Formanti Colonia per ml (UFC/ml). L'inoculo standardizzato viene poi distribuito in modo uniforme, mediante un tampone sterile, sulla superficie di piastre di MHA; i dischetti di antibiotici da saggiare vengono posizionati sterilmente sulla superficie della piastra, successivamente incubata in aerobiosi a 37°C per 24 h. Gli antibiotici saggiati sono stati: amoxicillina/acido clavulanico (20/10 µg) (AMC), aztreonam (30 µg) (ATM), ceftazidime (30 µg) (CAZ), cefotaxime (30 µg) (CTX), cefepime (30 µg) (FEP), imipenem (10 µg) (IPM), meropenem (10 µg) (MEM), ertapenem (10 µg) (ETP), ciprofloxacina (5 µg) (CIP), gentamicina (10 µg) (CN), cloramfenicolo (30 µg) (C) e trimetoprim-sulfametoxazolo (25 µg) (SXT).

ANTIBIOTICO	Concentrazione dischetto (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		
		S	I	R
Amoxicillina + Acido clavulanico	20 + 10	≥ 19	-	< 19
Aztreonam	30	≥ 26	21-25	< 21
Ceftazidime	30	≥ 22	19-21	< 19
Cefotaxime	30	≥ 20	17-19	< 17
Cefepime	30	≥ 27	24-26	< 24
Cloramfenicolo	30	≥ 17	-	< 17
Ciprofloxacina	5	≥ 25	22-24	< 22
Gentamicina	10	≥ 17	14-16	< 14
Ertapenem	10	≥ 25	-	< 25
Imipenem	10	≥ 22	17-21	< 17
Meropenem	10	≥ 22	16-21	< 16
Trimetoprim-Sulfametoxazolo	25	≥ 14	11-13	< 11

Tabella 2. Valori di riferimento per l'interpretazione dei diametri di inibizione per *Enterobacteriaceae*

2.3.2 Minima concentrazione inibente (MIC): sistema di valutazione quantitativo della sensibilità agli antibiotici da parte dei ceppi in esame che si ottiene mediante test di micro-diluizione in terreno liquido, secondo procedure standard (CLSI, 2015). Gli antibiotici saggiati sono stati: colistina (COL), ETP, MEM e IPM; per ognuno di questi il range finale di analisi era 32-0.015 µg/ml. Come criteri di interpretazione sono stati utilizzati i *breakpoint* forniti dal comitato EUCAST (EUCAST, 2019 www.eucast.org).

Procedura:

- Mediante pipetta multicanale, dispensare 50 µl di CAMHB su una piastra microtiter da 96 pozzetti (una per ogni antibiotico), escludendo la prima colonna.
- Dispensare 100 µl di antibiotico (32 µg/ml) sulla prima colonna.
- Eseguire una diluizione scalare dell'antibiotico passando da colonna a colonna con la pipetta multicanale avendo cura di escludere l'ultima colonna.
- Sospendere ogni ceppo in esame in 3 ml di CAMHB, procedendo poi ad un'opportuna diluizione necessaria per ottenere una densità ottica (misurata alla lunghezza d'onda di 625 nm) di 0.1.
- Eseguire una diluizione 1:100 della sospensione ottenuta. Dispensare 50 µl della sospensione diluita di ogni ceppo nella riga corrispondente, in modo da ottenere in ciascun pozzetto della microtiter una concentrazione finale di 5×10^5 UFC/ml.

I risultati vengono letti dopo 18-24 h di incubazione a 37°C in termostato. Il valore di MIC è determinato per ciascun campione e definito come la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita visibile.

ANTIBIOTICO	MIC (µg/ml)		
	S	I	R
Colistina	≤ 2	-	> 2
Ertapenem	≤ 0.5	-	> 0.5
Meropenem	≤ 2	3-8	> 8
Imipenem	≤ 2	3-4	> 4

Tabella 3. Valori di riferimento per l'interpretazione della minima concentrazione inibente per *Enterobacteriaceae* (EUCAST 2019).

2.4 Metodi fenotipici per determinare la produzione di ESBL e carbapenemasi

2.4.1 Double-Disc Synergy Test (DDST): metodo fenotipico utilizzato per rilevare la produzione di ESBL da parte dei ceppi in esame che prevede l'applicazione di due dischetti contenenti cefalosporine di III generazione (cefotaxime e ceftazidime) vicino ad un dischetto di amoxicillina/acido clavulanico (inibitore di β -lattamasi).

Procedura:

- Preparare una sospensione 0.5 McFarland da una coltura pura cresciuta *overnight* del ceppo in esame.
- Distribuire la sospensione ottenuta in modo omogeneo su una piastra di MHA utilizzando un tampone di cotone sterile.
- Applicare i dischetti di antibiotico da saggiare mantenendo tra loro uno spazio sufficiente per consentire successivamente la corretta misurazione delle zone di inibizione.
- Incubare a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 18–24 h.

Interpretazione del risultato:

Il test risulta positivo quando le zone di inibizione formatesi attorno ad uno dei dischetti contenenti cefalosporine sono aumentate nella direzione del dischetto contenente acido clavulanico. La *K. pneumoniae* ATCC 700603 è raccomandata per il Controllo di Qualità dei ceppi produttori di ESBL (Figura 3).

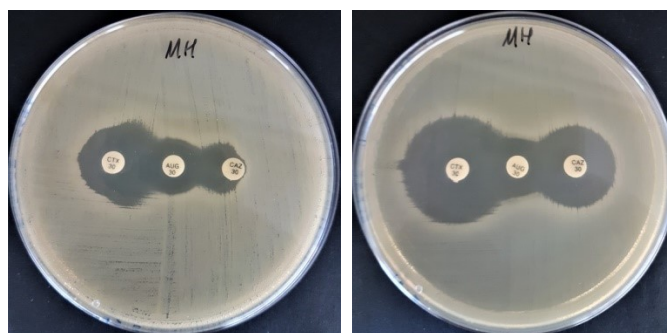


Figura 3. DDST. A destra test negativo (ATCC *E. coli* 35218, produttore di β -lattamasi non a spettro esteso), a sinistra test positivo (ATCC *K. pneumoniae* 700603, produttore di ESBL).

2.4.2 Test di Hodge modificato (MHT)

Molte tecniche possono essere usate per individuare la produzione di carbapenemasi, a partire dalle fenotipiche fino ad arrivare a quelle più avanzate di biologia molecolare. La tecnica del quadrifoglio, o test di Hodge modificato (MHT), è stata ampiamente utilizzata come metodo fenotipico per il rilevamento dell'attività carbapenemasi (www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/HodgeTest_Carbapenemase_Enterobacteriaceae.pdf); si tratta di un test basato sull'inattivazione di un carbapenemico da parte di un ceppo produttore di carbapenemasi, che consente al ceppo indicatore (*E. coli* ATCC® 25922), sensibile al carbapenemico in questione, di estendere la propria crescita verso il dischetto di carbapenemico, lungo la striscia di inoculo del ceppo produttore. Il test positivo è evidenziato dalla comparsa di un alone di inibizione cosiddetto a “quadrifoglio”.

Procedura:

- Preparare una sospensione 0.5 McFarland del ceppo indicatore (*E. coli* ATCC 25922) in 5 ml di brodo MHB o soluzione fisiologica.

- Eseguire una diluizione 1:10 aggiungendo 0.5 ml della sospensione standardizzata a 4.5 ml di MHB o soluzione fisiologica.
- Seminare l'inoculo diluito 1:10 su una piastra di MHA e lasciare asciugare per 3-5 minuti.
- Posizionare un dischetto da 10 µg di Meropenem o Ertapenem nel centro della piastra di MHA.
- Seguendo una linea dritta, strisciare il ceppo da testare dal bordo del dischetto fino al bordo della piastra. Ripetere la procedura con ceppi di controllo (QC) in un'altra direzione (possono essere testati fino a quattro ceppi sulla stessa piastra).
- Incubare overnight a 35°C ± 2°C per 16–24 h.

Interpretazione del risultato:

Al termine dell'incubazione, osservare la formazione di una rientranza simile a quella di un quadrifoglio a livello dell'intersezione tra il ceppo da testare ed *E. coli* 25922, all'interno della zona di inibizione del dischetto contenente il carbapenemico (Figura 4). Un test positivo indica la produzione di carbapenemasi da parte del ceppo in esame. L'assenza di crescita del ceppo indicatore *E. coli* ATCC 25922 attorno allo striscio del ceppo test indica un risultato negativo.

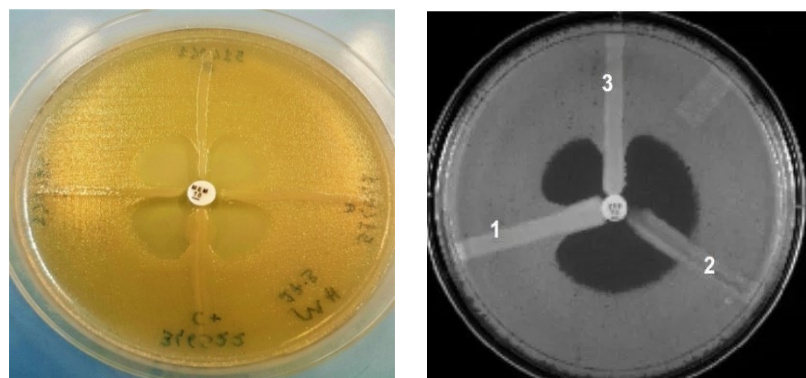


Figura 4. Test di Hodge modificato. A sinistra test positivo per 4 ceppi produttori di carbapenemasi; a destra, i ceppi seminati in posizione 1 e 3 sono produttori, mentre il ceppo 2 è non produttore.

2.4.3 Modified Carbapenem Inactivation method (mCIM)

L'mCIM è un metodo fenotipico ottimizzato per evidenziare la produzione di carbapenemasi in diverse specie batteriche (Pierce VM, 2017). Questo test si basa sul principio per cui, mettendo a contatto un dischetto di MEM (10 µg) in una sospensione di un microrganismo produttore di carbapenemasi, il carbapenemico contenuto in tale dischetto viene degradato dalle carbapenemasi; al contrario, se il microrganismo in esame non produce carbapenemasi, l'antibiotico mantiene la sua attività antimicrobica dopo l'incubazione nella sospensione batterica.

Procedura:

Utilizzando un'ansa sterile, viene stemperato 1 µl di colonia del ceppo da testare in una provetta contenente 2 ml di TSB; la sospensione batterica ottenuta va quindi passata al vortex per 10-15 s, dopo di che ad essa viene aggiunto in maniera asettica un dischetto di MEM da 10 µg. La provetta viene incubata per 4 h ± 15 min a 35°C ± 2°C. Poco prima del termine del tempo di incubazione per l'inattivazione del carbapenemico, viene preparata una sospensione 0.5 McFarland del ceppo indicatore per il test mCIM (*E. coli* ATCC 25922), la quale viene distribuita sull'intera superficie di una piastra di MHA secondo la procedura stabilita dal CLSI (CLSI, 2015). Al termine delle 4 h, il dischetto di MEM viene rimosso dalla sospensione batterica in TSB mediante un'ansa sterile da 10 µl; in particolare, l'ansa viene utilizzata per trascinare il dischetto lungo il bordo della provetta ed eliminare nel contempo l'eccesso di liquido. Il dischetto di antibiotico trattato viene infine posizionato sulla piastra di MHA già seminata con il ceppo reporter e si procede ad una incubazione di 18-24 h a 35°C ± 2°C.

Interpretazione:

La comparsa di un alone di inibizione intorno al dischetto di MEM con un diametro compreso tra i 6 mm e i 15 mm è considerato un risultato positivo. Un diametro compreso tra i 16 mm e i 18 mm è considerato un risultato intermedio (per cui sono necessarie ulteriori analisi o ripetizioni del test per stabilire la presenza o l'assenza di produzione delle carbapenemasi). Un diametro di inibizione maggiore di 19 mm è considerato un risultato negativo.

mCIM zone diameter	mCIM result
6-15 mm	Positivo
16-18 mm	Intermedio
≥ 19 mm	Negativo

Tabella 4. Interpretazione risultati mCIM (Pierce VM, 2017)

2.5. Procedure per l'analisi genotipica

2.5.1 Estrazione DNA genomico

L'estrazione del DNA è una procedura finalizzata alla separazione dell'acido nucleico da tutte le altre componenti cellulari; tale separazione si ottiene mediante una prima fase di lisi delle cellule ad opera di enzimi che rompono la parete e la membrana cellulare e una seconda fase di purificazione del campione necessaria ad eliminare tutto ciò che non è DNA e che potrebbe interferire con le reazioni successive (es. enzimi in grado di degradare l'acido nucleico). Il DNA totale dei ceppi in esame è stato ottenuto mediante il sistema di estrazione e purificazione GenElute

Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA-ALDRICH St Louis, MO), rispettando il seguente protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Protocollo:

- Preparare una sospensione batterica del ceppo in esame, stemperando una discreta quantità di colonia prelevata da una coltura pura fresca in 1.5 ml di soluzione fisiologica.
- Centrifugare per 2 minuti a 12.000-16.000 x g e con un colpo netto eliminare il sopranatante.
- Risospendere il pellet con 180 µl di Lysis Solution T (Buffer STL per GenElute Mammalian Genomic DNA Kit).
- Aggiungere 20 µl di RNasi A Solution, mescolare e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 20 µl di una soluzione di Proteinasi K (va ricostituita in H₂O ad una concentrazione di 20.000 µg/ml), mescolare e incubare per 30 minuti a 55°C.
- Aggiungere 200 µl di Lysis Solution C, vortexare per circa 15 s e incubare per 10 minuti a 55°C.
- Inserire la colonnina fornita dal kit in una eppendorf da 2 ml, aggiungere 500 µl di Column Preparation Solution, centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluato.
- Aggiungere 200 µl di etanolo assoluto al lisato e vortexare per 5-10 s.
- Trasferire l'intero lisato nella colonnina preparata precedentemente, centrifugare a 6500 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluato.
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf, aggiungere 500 µl di Wash Solution 1, centrifugare a 6500 x g per 1 minuto ed eliminare l'eluato.
- Aggiungere 500 µl di Wash Solution Concentrate, centrifugare alla massima velocità (12.000-16.000 x g) per 3 minuti ed eliminare l'eluato.

- Centrifugare nuovamente la colonnina per 1 minuto alla massima velocità.
- 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 6500 x g per 1 minuto.
- Conservare l'eluito finale (ca. 200 μ l), contenente il DNA genomico purificato, a -20°C.

2.5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR è una tecnica di amplificazione genica che permette di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte di acido nucleico; si tratta della ricostruzione artificiale del processo naturale di sintesi genica a partire da un singolo filamento di DNA, il quale fa da stampo per la costruzione del filamento complementare, costruito nucleotide per nucleotide. Lo strumento in cui avviene la reazione è il termociclatore, nel quale si succedono vari cicli di amplificazione determinati dall'alternanza di tre diverse temperature.

Ogni ciclo di amplificazione consta di tre fasi:

- **Denaturazione** (94-95°C; 3-5 minuti) → i filamenti di DNA a doppia elica, sottoposti ad alte temperature, si separano in filamenti singoli.
- **Annealing** (30 s - 1 minuto) → appaiamento dei primers alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari. La temperatura di annealing (T_A) 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; quest'ultima viene calcolata secondo la seguente formula:

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)]^\circ C$$

Nel caso in cui i due primers abbiano temperature di Melting diverse, di solito si prende in considerazione quello con la T_M più bassa. Generalmente si utilizza come temperatura di annealing la $T_M - 5^\circ C$, anche se spesso l'utilizzo diretto della stessa T_M può portare ad avere ottime rese nella reazione di PCR.

- **Estensione** ($72^\circ C$) → 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.

Queste tre fasi si ripetono per un numero di cicli che 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.

Rilevazione dei geni codificanti carbapenemasi mediante

Multiplex PCR

La ricerca dei principali geni che codificano le diverse classi di carbapenemasi (bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48}) è stata effettuata utilizzando i primers descritti da Poirel *et al.* (Poirel L, 2011). In Tabella 5

sono riportate le coppie di primers utilizzate nell'amplificazione VIM – IMP; in tabella 6 sono riportate le coppie di primers utilizzate nell'amplificazione KPC – NDM e OXA-48.

Primers	Sequenza	Gene	Dimensione del prodotto in bp
VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	<i>bla</i> _{VIM}	390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC	<i>bla</i> _{IMP}	232
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		

Tabella 5. Primers per la ricerca dei geni codificanti carbapenemasi *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}.

Primers	Sequenza	Gene	Dimensione del prodotto in bp
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>bla</i> _{KPC}	798
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla</i> _{NDM}	621
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla</i> _{OXA-48}	438
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		

Tabella 6. Primers per la ricerca dei geni codificanti carbapenemasi *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}.

Programma di amplificazione:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 10 minuti

- 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 52°C per 40 secondi e polimerizzazione a 72°C per 50 secondi
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5 minuti

L'elenco dei componenti utilizzati per l'amplificazione, le concentrazioni finali e il mix di reazione sono riportati di seguito:

Componente	Concentrazione finale	Volume finale
DNA genomico	2µl	2 µl
Buffer 10X	1X	5 µl
dNTP	200 µM	1 µl
Primers	0.5 µM	0.25 µl
DreamTaq	1U	0.25 µl
Acqua MilliQ sterile		fino a 50 µl

Applicazione della PCR per la determinazione dei geni codificanti ESBL

La ricerca di altri geni di β-lattamasi (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*) è stata effettuata utilizzando primers di letteratura ([Pagani L, 2003](#); [Dallenne C, 2010](#)). Le coppie di primers sono riportate in Tabella 7.

Primers	Sequenza	Gene	Dimensione del prodotto in bp
CTX-M1 CTX-M2	ATGTGCAGYACCAGTAARGT TGGGTRAARTARGTSACCAGA	<i>bla_{CTX-M}</i>	593
TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTCCG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	<i>bla_{TEM}</i>	861
SHV-F SHV-R	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC ATCCCGCAGATAAATCACCAC	<i>bla_{SHV}</i>	713

Tabella 7. Primers per la ricerca dei geni codificanti EBSL *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}*.

Programma di amplificazione

CTX-M:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 7 minuti
- 35 cicli di denaturazione a 94°C per 50 secondi, annealing a 50°C per 40 secondi e polimerizzazione a 72°C per 1 minuto
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5 minuti

TEM:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 53-55°C per 1 minuto e polimerizzazione a 72°C per 1 minuto
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5 minuti

SHV:

- Denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti
- 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 58°C per 1 minuto e polimerizzazione a 72°C per 1 minuto
- Ciclo di allungamento finale a 72°C per 5 minuti

L'elenco dei componenti utilizzati per l'amplificazione, le concentrazioni finali e il mix di reazione sono riportati di seguito:

Componente finale	Concentrazione finale	Volume
DNA genomico	non standardizzata	2-5 µl
Buffer 10X	1X	5 µl
dNTP	200 µM	1 µl
Primers	0.4 µM	0.2 µl
DreamTaq	1U	0.25 µl
Acqua MilliQ sterile		fino a 50 µl

2.5.3 Elettroforesi in gel di agarosio

L'elettroforesi su gel è una tecnica che consente di separare le molecole di acido nucleico attraverso l'applicazione di un campo elettrico. Essendo carico negativamente, il DNA tende a migrare verso l'anodo (polo positivo), più o meno rapidamente a seconda delle sue dimensioni; le molecole più piccole risultano avere una mobilità elettroforetica maggiore, dal momento che vengono frenate meno dal setaccio molecolare creato dal gel rispetto alle molecole più grandi.

Le sostanze utilizzate per eseguire la corsa elettroforetica sono state:

- **GelGreen** (Società Italiana Chimici) → molecola fluorescente intercalante del DNA per la visualizzazione delle bande di amplificazione mediante transilluminazione UV.
- **Loadind dye** → miscela contenente blu di bromofenolo che consente di seguire visivamente l'elettroforesi dei campioni e glicerolo, che 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:

- Preparare gel (1%) aggiungendo 1 g di agarosio a 100 ml di TAE 1X.
- Aggiungere 300 µl di GelGreen e lasciare solidificare il gel in apposito sistema dotato di pettine per la formazione dei pozzetti.

- Posizionare il gel nella vaschetta di elettroforesi contenente il tampone di corsa (TAE 1X) e caricare i campioni mescolando 10 μ l di DNA amplificato a 2 μ l di Loading Dye.
- Caricare 5 μ l di marker 100 bp plus (range, 100-3000 bp) e attivare il sistema applicando un voltaggio costante (90 V).
- Dopo circa 30-40 minuti di corsa elettroforetica visualizzare le bande di DNA mediante trans-illuminatore UV.

Risultati

Dallo screening realizzato per isolare ed identificare i batteri resistenti ai carbapenemi (CRE e CPE) in campioni fecali sono stati ottenuti 45 isolati (positività del 6.9%) confermati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, su un totale di 652 campioni. Nel corso dello screening sono stati isolati anche 77 ceppi di *Pseudomonas* spp. (pari a 11.8%) che tuttavia non sono stati inclusi in questo studio.

In base ai dati dell'antibiogramma, i 45 ceppi sono stati analizzati in dettaglio poiché presentanti almeno un risultato di non sensibilità ai carbapenemi (EUCAST). La figura 5 mostra la distribuzione in base all'identificazione di specie: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E.coli*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e altre specie.

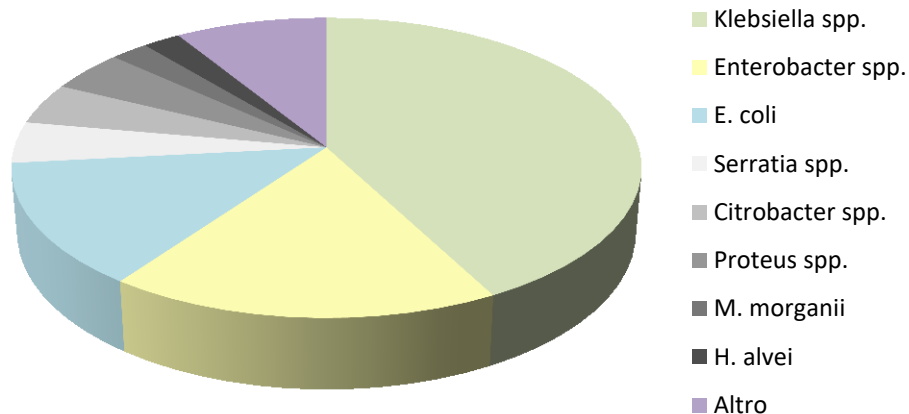


Figura 5. Distribuzione dei ceppi di *Enterobacteriaceae* positivi allo screening in funzione della specie.

Dal grafico si può notare una netta prevalenza di batteri appartenenti al genere *Klebsiella* (n. 19, 42%); in particolare, un solo isolato apparteneva alla specie *K. ozaenae*, mentre tutti gli altri erano *K. pneumoniae*. Al secondo posto in ordine di frequenza troviamo il genere *Enterobacter* (n. 8,

18%), seguito dalla specie *E. coli* (n. 6, 13%). Per quanto riguarda gli altri generi/specie, sono stati isolati n. 2 ceppi (4%) per ciascuno dei generi *Serratia*, *Citrobacter* e *Proteus*, e un unico isolato (2%) per le specie *M. morgani* e *H. alvei*. Altri ceppi isolati appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae* ma non identificati a livello di genere/specie costituivano il 9% della positività.

3.1 Determinazione della sensibilità agli antibiotici

Tutti i 45 ceppi positivi allo screening 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 8 è riportato il resistotipo e la classificazione dei 45 sulla base di quest'ultimo.

Ceppo	Carbapenemi			Altri β -lattamici				Antibiotici non β -lattamici					Classificazione		
	IPM	MEM	ETP	ATM	CTX (II)	CAZ (III)	FEP (IV)	CIP	CN	SXT	C	CT	CRE	CPE	MDR
72504	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	CRE		
77169	S	S	R	S	S	I	S	S	R	S	S	R			MDR
79342	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	CRE		
33051	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S			MDR
35124	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S			
48554	S	I	R	R	R	R	I	S	S	S	R	S	CRE		
56939	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	CRE		
55112	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
72134	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	CRE		
69988-1	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S			
69988-2	S	S	I	R	R	R	R	R	I	R	S	S			MDR
69874	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S			
70082-1	I	S	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	CRE		
506206	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
506362	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S		CPE	
506959	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S			MDR
506594	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
507382	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	S		CPE	MDR
37080	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
37377	I	I	R	I	R	R	I	S	S	S	S	R	CRE		

508650	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S		CPE	MDR
52828	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S			
57327	S	S	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S			MDR
511724	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S			MDR
511439	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S		CPE	MDR
510688	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S			
514041	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S		CPE	MDR
516693	S	S	I	I	R	R	I	S	S	S	S	S			
77871	S	S	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S			
36740 A	S	I	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	CRE		MDR
42112	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R			
522445	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
523300	S	S	I	S	I	R	R	I	R	R	R	R			MDR
525173	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	CRE		MDR
525328	S	S	I	I	S	R	R	S	I	R	S	S			MDR
33690 A	S	I	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	CRE		
527838	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R			
527838	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	R	CRE		MDR
528046	S	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S			MDR
527640	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S			
528023	S	S	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R			MDR
38042	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S			MDR
530175	I	S	I	S	S	S	S	I	R	R	S	R	CRE		MDR
530071	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R			
45993-A	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CRE		MDR

Tabella 8. Distribuzione dei 45 ceppi positivi allo screening in funzione del resistotipo.

Come anticipato, tutti i 45 ceppi hanno mostrato una resistenza o una non sensibilità ad almeno un carbapenemico (ETP); in particolare, sono stati indicati come CRE tutti gli isolati risultati resistenti o non sensibili ad almeno due carbapenemici, come CPE i ceppi produttori di carbapenemasi e come MDR tutti i ceppi risultati resistenti o non sensibili ad almeno 3 diverse classi di antibiotici testate.

Dai dati ottenuti dall'antibiogramma e dalla MIC è emerso che 8 ceppi (1.2%) erano CRE, 11 ceppi (1.7%) erano MDR e 10 ceppi (1.5%) erano sia CRE che MDR. 11 ceppi (1.7%) pur avendo superato lo screening, non sono stati classificati come resistenti. I ceppi CPE, in base ai risultati dei

test fenotipici MHT e mCIM, confermati dall'analisi genotipica, sono risultati essere 5 (0.8%) e tutti appartenenti alla specie *K. pneumoniae*; 4 di essi, oltre che CPE, dimostravano di essere MDR.

L'analisi del resistotipo ha messo anche in luce che 6 dei 10 ceppi CRE-MDR erano resistenti a tutti gli antibiotici saggiati, fatta eccezione per la colistina.

3.2 Metodi fenotipici per determinare la produzione di ESBL e carbapenemasi

La produzione di carbapenemasi è stata valutata mediante i test fenotipici MHT e mCIM, mentre la produzione di ESBL è stata testata attraverso il DDST. La tabella 9 riporta i risultati ottenuti per ciascuno dei 45 ceppi positivi allo screening.

N°	Test fenotipici		
	MHT	mCIM	DD (ESBL)
72504	-	-	-
77169	-	-	-
79342	-	-	+
33051	-	-	+
35124	-	-	-
48554	incerto	-	-
56939	-	-	-
55112	-	-	-
72134	-	-	-
69988-1	-	-	-
69988-2	-	-	+
69874	-	-	-
70082-1	-	-	-
506206	-	-	-
506362	+	+	-
506959	-	-	+
506594	-	-	-

N°	Test fenotipici		
	MHT	mCIM	DD (ESBL)
511724	-	-	-
511439	+	+	-
510688	-	-	-
514041	+	+	-
516693	incerto	-	+
77871	-	-	-
36740 A	-	-	-
42112	incerto	-	-
522445	-	-	-
523300	-	-	-
525173	-	-	-
525328	-	-	+
33690 A	incerto	-	-
527838	-	-	-
527838	-	-	-
528046	-	-	+
527640	-	-	-

507382	+	+	-
37080	-	-	-
37377	-	-	-
508650	+	+	-
52828	-	-	-
57327	-	-	-

528023	-	-	-
38042	-	-	-
530175	incerto	-	-
530071	-	-	-
45993-A	-	-	+

Tabella 9. Risultati della valutazione fenotipica finalizzata alla ricerca di carbapenemasi ed ESBL nei 45 ceppi positivi allo screening.

Per quanto riguarda il test MHT, tutti i 5 ceppi CPE sono risultati positivi (pari all'11.1% dei ceppi esaminati), 35 ceppi (77.8%) sono risultati negativi e 5 ceppi (11.1%) hanno dato un risultato incerto. Mediante il test mCIM solo i 5 ceppi CPE (11.1%) sono risultati positivi, mentre i restanti 40 ceppi hanno dato un risultato negativo (88.9%).

Il confronto dei risultati ottenuti con entrambi i test ha evidenziato che nei casi di dubbia interpretazione del test MHT, il test mCIM si dimostrava più affidabile fornendo un'interpretazione del risultato migliore e meno soggetta ad interpretazioni soggettive. Difatti, anche se entrambi i test evidenziano la produzione di carbapenemasi dal punto di vista fenotipico, il test mCIM è più sensibile e specifico rispetto al MHT. Il test MHT ha buoni valori di sensibilità e specificità (>90%) e risulta largamente utilizzato nei laboratori ospedalieri poiché è utile nel discriminare i ceppi produttori di KPC ([Anderson KF, 2007](#)), che sono i più frequenti in ambito nosocomiale; tuttavia in diversi casi può essere difficile l'interpretazione dei risultati in isolati con altre carbapenemasi o che hanno una combinazione di diversi meccanismi di resistenza, come produzione di enzimi AmpC e modificazioni delle porine di membrana ([Iovleva A, 2017](#)).

Al contrario, il test mCIM, basandosi sull'evidenza di un'attività carbapenemasi, ha mostrato di avere sensibilità e specificità di oltre il 99%, facilità di esecuzione e di interpretazione, utile per la classificazione di CPE e produzione di diverse carbapenemasi ([Pierce VM, 2017](#)).

Infine, la ricerca delle EBSL ha mostrato una positività per 8 ceppi (17.8%) e una negatività per i restanti 37 ceppi (82.2%).

3.3 Analisi genotipica

I geni che codificano per le principali carbapenemasi (KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48) sono stati ricercati mediante la tecnica di Multiplex PCR (Poirel L, 2011). In tutti i casi dubbi (presenza di due bande di amplificazione e/o di prodotti debolmente positivi) sono state eseguite delle prove di amplificazione utilizzando la coppia di primer specifica per i singoli geni. Al termine delle indagini, comprensive della ricerca dei geni codificanti altre β -lattamasi (TEM, SHV, CTX-M e CMY), sono stati ottenuti i seguenti risultati.

N°	Geni <i>bla</i> di CARBAPENEMASI					Altri geni <i>bla</i>			
	KPC	NDM	OXA-48	VIM	IMP	TEM	SHV	CTX-M	CMY
72504	-	-	-	-	-	-	SHV	-	-
77169	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79342	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
33051	-	-	-	-	-	TEM	SHV	CTX-M	-
35124	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48554	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56939	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55112	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
72134	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69988-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69988-2	-	-	-	-	-	-	SHV	CTX-M	-
69874	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70082-1	-	-	-	-	-	-	-	-	CMY
506206	-	-	-	-	-	-	SHV	CTX-M	-
506362	KPC	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
506959	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
506594	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
507382	KPC	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
37080	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
37377	-	-	-	-	-	-	SHV	-	-

508650	KPC	-	-	-	-	TEM	SHV	CTX-M	-
52828	-	-	-	-	-	-	-	CTX-M	-
57327	-	-	-	-	-	-	-	-	-
511724	-	-	-	-	-	-	SHV	-	-
511439	KPC	-	-	-	-	-	-	-	-
510688	-	-	-	-	-	-	-	CTX-M	-
514041	KPC	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
516693	-	-	-	-	-	-	-	-	CMY
77871	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36740 A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
522445	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
523300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
525173	-	-	-	-	-	TEM	-	CTX-M	-
525328	-	-	-	-	-	TEM	-	-	-
33690-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
527838	-	-	-	-	-	-	-	-	-
527838	-	-	-	-	-	TEM	-	-	-
528046	-	-	-	-	-	-	-	CTX-M	-
527640	-	-	-	-	-	TEM	-	-	-
528023	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38042	-	-	-	-	-	TEM	-	-	-
530175	-	-	-	-	-	TEM	SHV	-	-
530071	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45993-A	-	-	-	-	-	TEM	SHV	CTX-M	-

Tabella 10. Risultati dell'analisi genotipica finalizzata alla ricerca di geni codificanti per carbapenemasi ed ESBL nei 45 ceppi positivi allo screening.

La tabella mette in evidenza 5 ceppi (11.1%) produttori di KPC, i quali corrispondono ai 5 isolati di *K. pneumoniae* resistenti a tutti e tre i carbapenemici (ETP, IPM, MEM) e positivi ad entrambi i test fenotipici MHT e mCIM; la valutazione molecolare e la determinazione delle carbapenemasi ha confermato la maggiore capacità discriminante del test mCIM nel corso dello screening iniziale.

In merito alla produzione di altre β -lattamasi (TEM-SHV) e della EBSL CTX-M, 4 ceppi (8.9%) hanno mostrato una singola positività per bla_{TEM} , 3 ceppi (6.7%) hanno mostrato una singola positività per bla_{SHV} , 3 ceppi

(6.7%) hanno mostrato una singola positività per bla_{CTX-M} ed infine, 2 ceppi (4.4%) hanno mostrato una singola positività per bla_{CMY} . Inoltre, 10 ceppi (22.2%) sono risultati positivi sia per bla_{TEM} che per bla_{CTX-M} , 2 ceppi (4.4%) sono risultati positivi sia per bla_{SHV} che per bla_{CTX-M} , un unico ceppo (2.2%) è risultato positivo sia per bla_{TEM} che per bla_{SHV} ed infine 3 ceppi (6.7%) hanno mostrato una tripla positività per bla_{TEM} , bla_{SHV} e bla_{CTX-M} .

Discussione e conclusioni

Gli enterobatteri produttori di carbapenemasi sono batteri il cui meccanismo di resistenza nei confronti dei carbapenemici dipende specificamente dalla produzione di particolari enzimi in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico. La rapida diffusione di questi microrganismi verificatasi negli ultimi anni è diventato un problema di salute pubblica globale, non solo perché in questo caso la resistenza è rivolta a farmaci antimicrobici di ultima generazione, fondamentali per la prevenzione e il trattamento delle infezioni da batteri MDR che coinvolgono pazienti nelle strutture ospedaliere, ma anche per il fatto che gran parte dei geni che codificano per le carbapenemasi risiedono su plasmidi coniugativi, i quali possono trasmettersi facilmente nell'ambito degli enterobatteri così come in quello di altre specie Gram-negative (Iovleva A, 2017). La rilevanza clinica dei ceppi CPE è correlata anche al fatto che le carbapenemasi conferiscono resistenza o ridotta sensibilità a tutti o quasi tutti i β -lattamici; inoltre, la maggior parte di questi batteri risultano essere fenotipicamente multi- o estensivamente-resistenti ad altre classi di farmaci.

Per tutte queste problematiche, e anche perché l'Italia risulta essere un Paese fortemente colpito da questo fenomeno (Giani T, 2017), diventa di estrema importanza mettere in atto diverse strategie per contrastare la diffusione dei ceppi CPE, soprattutto nelle strutture ospedaliere dove le infezioni sono associate ad un elevato tasso di mortalità.

Lo scopo di questo studio è stato quello di studiare la prevalenza della colonizzazione da parte di enterobatteri resistenti ai carbapenemici mediante uno screening culturale/fenotipico di campioni fecali. Tutti i ceppi cresciuti sono stati identificati e ne sono state studiate le caratteristiche fenotipiche e genotipiche di resistenza. Il criterio di selezione dello studio era basato sulla resistenza o non sensibilità ad almeno un carbapenemico.

Sono state studiate le resistenze di classi distinte di antibiotici: penicilline

(amoxicillina/clavulanato), cefalosporine (cefotaxime, ceftazidime, cefepime), monobattami (aztreonam) e carbapenemici (imipenem, meropenem, ertapenem) tra i β -lattamici; trimetoprim-sulfametoxazolo; fluorochinoloni (ciprofloxacina); aminoglicosidi (gentamicina); polimixine (colistina) e cloramfenicolo.

In base allo screening iniziale, il 6.9% dei campioni esaminati (n. 652) risultava resistente o non sensibile ai carbapenemici; lo 0.8% dei ceppi (n. 5), identificati come *K. pneumoniae*, era produttore di carbapenemasi e presentava livelli elevati di resistenza a tutti i carbapenemi in uso. Inoltre, 4 dei 5 CPE isolati erano multiresistenti. Un totale di 18 ceppi (2.7% del totale dei campioni) è stato classificato come CRE; tutti gli isolati risultavano negativi per la produzione di carbapenemasi, ma mostravano resistenza o non sensibilità ad almeno due carbapenemi, associata presumibilmente a meccanismi di modificazione o perdita di porine in combinazione con la produzione di altre β -lattamasi.

Mettendo a confronto i risultati fenotipici con quelli genotipici, è stata dimostrata una corrispondenza tra la positività ai due test finalizzati alla determinazione della produzione di carbapenemasi (MHT e mCIM) e la rilevazione dei geni tramite amplificazione genica, per cui solo i 5 ceppi che erano positivi ad entrambi i test fenotipici hanno poi effettivamente mostrato di possedere i geni codificanti per le carbapenemasi; in particolare, i ceppi in questione erano classificati *K. pneumoniae* e producevano l'enzima KPC. Nel campione selezionato non è stata identificata nessun'altra classe di geni *bla* (VIM, OXA-48, IMP e NDM); questo dato sembra essere in linea con quelli di altri studi italiani precedenti, dove KPC risulta la carbapenemasi più diffusa in Italia ([Giani T, 2017](#)).

4.1 Conclusioni

Nonostante questo screening rappresenti una fase preliminare di un progetto di ricerca più ampio, è stato ugualmente possibile selezionare e caratterizzare, da campioni di feci, sia ceppi produttori di carbapenemasi

(CPE) che resistenti ai carbapenemi (CRE) in un campione di popolazione eterogeneo per età e provenienza, costituito da pazienti pediatrici ed adulti, sia ospedalizzati sia provenienti da lungodegenze o da ambulatori esterni. La prevalenza di ceppi CPE è stata dello 0.77% sul totale dei campioni esaminati. Tutti i ceppi, identificati come *K. pneumoniae*, erano produttori dell'enzima KPC, un quadro che potrebbe riflettere la possibile diffusione di questi batteri dall'ambiente ospedaliero alla comunità come è già stato ipotizzato per diverse altre zone dell'Italia. Tuttavia, rispetto ad altri lavori di sorveglianza, che sono focalizzati per lo più sulla realtà nosocomiale dell'AMR, è stata ottenuta una quota circa 4 volte maggiore di ceppi CRE (2.76%) rispetto ai CPE. Tale risultato sembrerebbe indicare una più diffusa prevalenza e colonizzazione intestinale dovuta a questo tipo di batteri resistenti ai carbapenemici piuttosto che ad isolati produttori di carbapenemasi.

Bibliografia

- **Albiger B, Glasner C, Struelens MJ et al.** 2015. “Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015”. Euro Surveill. **20(45)**. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062.
- **Ambler RP.** 1980. “The structure of β -lactamases”. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **Mag; 289 (1036): 321-331**. DOI:10.1098/rstb.1980.0049.
- **Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al.** 2007. “Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*”. J Clin Microbiol. **Ago; 45 (8): 2723-2725**. DOI: 10.1128 / JCM.00015-07.
- **Bradford PA, Bratu S, Urbano C et al.** 2004. “Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City”. Clin Infect Dis. **Lug; 39 (1): 55–60**. DOI: 10.1086 / 421495.
- **Bratu S, Landman D, Haag R et al.** 2005. “Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium”. Arch Intern Med. **Giu; 165 (12): 1430–1435**. DOI: 10.1001 / archinte.165.12.1430.
- **Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S et al.** 2019. “Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018”. Euro Surveill. **Feb; 24(9)**. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123.
- **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.

- **Castanheira M, Deshpande LM, Farrell SE et al.** 2013. “Update on the prevalence and genetic characterization of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals during 2010”. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **Feb; 75 (2): 210–213**. DOI: 10.1016 / j.diagmicrobio.2012.10.017.
- **Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D et al.** 2011. “Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007”. *Antimicrob Agents Chemother.* **Mar; 55 (3): 1274–1278**. DOI: 10.1128 / AAC.01497-10.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2013. “Vital Signs: Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*”. *Centers for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report.* **62: 165-170**.
- **Clancy JC, Hao B, Shields RK et al.** 2014. “Doripenem, Gentamicin, and Colistin, Alone and in Combinations, against Gentamicin-Susceptible, KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains with Various ompK36 Genotypes”. *Antimicrob Agents Chemother.* **Giu; 58 (6): 3521–3525**. DOI: 10.1128 / AAC.01949-13.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.** **Wayne, PA.** 2015. *Verification of Commercial Microbial Identification 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.
- **Day KM, Ali S, Mirza IA et al.** 2013. “Prevalence and molecular characterization of *Enterobacteriaceae* producing NDM-1

- carbapenemase at a military hospital in Pakistan and evaluation of two chromogenic media”. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **Feb; 75 (2): 187–191**. DOI: 10.1016 / j.diagmicrobio.2012.11.006.
- **Decousser JW, Poirel L, Nordmann P**. 2001. “Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*”. *Antimicrob Agents Chemother*. **Dic; 45 (12): 3595-3598**. DOI: 10.1128 / AAC.45.12.3595-3598.2001.
 - **EUCAST**. 2019. “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters”. Version 9.0 www.eucast.org.
 - **Giani T, Antonelli A, Caltagirone M et al**. 2017. “Evolving β -lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients”. *Euro Surveill*. **Ago; 22 (31)**. pii: 30583. DOI: 10.2807 / 1560-7917.ES.2017.22.31.30583.
 - **Giani T, D'Andrea MM, Pecile P et al**. 2009. “Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase”. *J Clin Microbiol*. **Nov; 47 (11): 3793-3794**. DOI: 10.1128 / JCM.01773-09.
 - **Giani T, Pini B, Arena F et al**. 2013. “Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011”. *Euro Surveill*. **Mag; 18 (22)**. pii: 20489.
 - **Girlich D, Poirel L, Nordmann P et al**. 2012. “Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*”. *J Clin Microbiol*. **Feb; 50 (2): 477-479**. DOI: 10.1128 / JCM.05247-11.
 - **Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ**. 2011. “Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention”. *Clin Infect Dis*. **Lug; 53 (1): 60–67**. DOI: 10.1093 / cid / cir202.

- **Iovleva A, Doi Y.** 2017. “Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*”. Clin Lab Med. **Jun; 37(2): 303-315**. DOI: 10.1016 / j.cll.2017.01.005.
- **Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S et al.** 1995. “Plasmid-Mediated Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene blaIMP among Clinically Isolated Strains of *Serratia marcescens*”. Antimicrob Agents Chemother. **Apr; 39 (4): 824-829**. DOI: 10.1128 / aac.39.4.824.
- **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al.** 1999. “Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate”. Antimicrob Agents Chemother. **Jul; 43 (7): 1584–1590**.
- **Lee C-R, Lee JH, Park KS et al.** 2016. “Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods”. Front Microbiol. **Giu; 7 (895)**. DOI: 10.3389 / fmicb.2016.00895.
- **Lee K, Lim YS, Yong D et al.** 2003. “Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp”. J Clin Microbiol. **Ott; 41 (10): 4623-4629**. DOI: 10.1128 / jcm.41.10.4623-4629.2003.
- **Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A et al.** 2009. “Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece)”. J Infect. **Mar; 58 (3): 213–219**. DOI: 10.1016 / j.jinf.2009.01.010.
- **Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J.** 2013. “First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the “menace” arrives in the new world”. J Clin Microbiol. **Feb; 51 (2): 680–683**. DOI: 10.1128 / JCM.02580-12.
- **Nordmann P, Poirel L.** 2014. “The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide”.

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.
- **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.
- **Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR et al.** 2017. “Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*”. **Ago**; **55 (8): 2321-2333**. DOI: 10.1128 / JCM.00193-17.
- **Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P.** 2004. “Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*”. Antimicrob Agents Chemother. **Gen**; **48 (1): 15–22**. DOI: 10.1128 / AAC.48.1.15-22.2004.
- **Poirel L, Kampf P, Nordmann P.** 2002. “Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases”. Antimicrob Agents Chemother. **Dic**; **46 (12): 4038-4040**. DOI: 10.1128 / AAC.46.12.4038-4040.2002.
- **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.
- **Poirel L, Héritier C, Podglajen I et al.** 2003. “Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV β -

Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem”. *Antimicrob Agents Chemother.* **Feb; 47 (2): 755-758**. DOI: 10.1128 / AAC.47.2.755-758.2003.

- **Sader HS, Mendes RE, Pfaller MA et al.** 2018. “Antimicrobial activities of aztreonam-avibactam and comparator agents against contemporary (2016) clinical *Enterobacteriaceae* isolates”. *Antimicrob Agents Chemother.* **Dic; 62 (1)**. pii: e01856-17. DOI: 10.1128 / AAC.01856-17.
- **Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y et al.** 2007. “Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel”. *Int J Antimicrob Agents.* **Dic; 30 (6): 525–529**. DOI: 10.1016 / j.ijantimicag.2007.07.024.
- **Tumbarello M, Treccarichi EM, De Rosa FG et al.** 2015. “Infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study”. *J Antimicrob Chemother.* **Lug; 70 (7): 2133-2143**. DOI: 10.1093 / jac / dkv086.
- **Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M et al.** 2012. “Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions”. *Clin Microbiol Rev.* **Ott; 25 (4): 682–707**. DOI: 10.1128 / CMR.05035-11.
- **Tzouvelekis LS, Bonomo RA.** 1999. “SHV-type β -lactamases”. *Curr Pharm Des.* **Nov; 5 (11): 847-864**.
- **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** 2011. “Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance”. *FEMS Microbiol Rev.* **Set; 35 (5): 736–755**. DOI: 10.1111 / j.1574-6976.2011.00268.x.
- **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 et al.** 2009. “Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India”. *Antimicrob Agents Chemother.* **Dec; 53 (12): 5046–5054.** DOI: 10.1128 / AAC.00774-09.
- **Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL.** 2013. “ β -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian Peninsula”. *Clin Microbiol Rev.* **Lug; 26 (3): 361–380.** DOI: 10.1128 / CMR.00096-12.

Ringraziamenti

Giunta al termine di questa tesi, vorrei dedicare alcune righe a tutti coloro che mi sono stati vicini in questi anni, contribuendo al raggiungimento di questo traguardo.

Innanzitutto desidero ringraziare la mia relatrice, la Dott.ssa Marina Mingoia, per la grande conoscenza che mi ha trasmesso, per la disponibilità e professionalità dimostratemi nel corso di questi mesi di lavoro e per il tempo dedicatomi nella correzione della tesi.

Un sincero “grazie” lo dedico a Gloria Magi, la mia correlatrice, che con pazienza mi ha guidato nell’apprendimento di numerose tecniche, sostenendomi e consigliandomi dove non riuscivo.

Ringrazio tutto il personale del laboratorio di Microbiologia per avermi aiutato ogni volta che ne avevo bisogno.

Ringrazio il Coordinatore Giorgio Bettarelli e il Tutor Massimo Gambella per aver seguito me e i miei compagni di corso durante questi tre anni di università.

Un ringraziamento speciale va sicuramente alla mia famiglia, in particolare ai miei genitori che mi hanno sostenuto sia dal punto di vista economico che da quello morale, ai miei fratelli Davide e Martina che hanno creduto in me in ogni momento incoraggiandomi prima di ogni esame e a mia cugina Elisa, che considero come una sorella sulla quale posso sempre contare.

Infine vorrei ringraziare le mie coinquiline e i miei amici, in particolare Anna e Lucia, amiche da una vita, e Federica, compagna di tesi con cui ho condiviso il tirocinio.

Grazie a tutti!!

Federica