



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

VALUTAZIONE DELLA DIFFUSIONE DI  
BATTERI RESISTENTI AI CARBAPENEMI NELLA  
FILIERA SUINA DELLA REGIONE MARCHE

EVALUATION OF THE SPREAD OF  
CARBAPENEM-RESISTANT BACTERIA IN THE  
MARCHE REGION SWINE SUPPLY CHAIN

TESI SPERIMENTALE

Studente:

MARTA BERNILE

Relatore:

PROF. CRISTIANA GAROFALO

Correlatori:

DOTT. SERENA SIMONI

DOTT. VESNA MILANOVIC

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

# SOMMARIO

<b>ELENCO DELLE TABELLE</b> .....	<b>2</b>
<b>ELENCO DELLE FIGURE</b> .....	<b>3</b>
<b>ACRONIMI E ABBREVIAZIONI</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>5</b>
1.1 ANTIBIOTICI E CARBAPENEMI.....	5
1.1.1 <i>Definizione di antibiotico</i> .....	5
1.2 ANTIBIOTICO-RESISTENZA.....	9
1.2.1 <i>Principali meccanismi di resistenza agli antibiotici</i> .....	9
1.2.2 <i>Resistenza ai carbapenemi</i> .....	11
1.3 SERBATOI DI RESISTENZA AI CARBAPENEMI.....	13
1.3.1 <i>Resistenza ai carbapenemi negli allevamenti</i> .....	14
1.3.2 <i>Epidemiologia e trasmissione delle resistenze agli antibiotici tra animali e tra animali e uomo</i> .....	16
1.4 SCOPO DELLA TESI.....	22
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>24</b>
2.1 CAMPIONAMENTO.....	24
2.2 LA PREPARAZIONE DEI SUBSTRATI DI CRESCITA .....	26
2.2.1 <i>Terreno MacConkey Agar</i> .....	26
2.2.2 <i>Terreno LB</i> .....	27
2.2.3 <i>Acqua peptonata</i> .....	28
2.2.4 <i>Terreno MH Agar</i> .....	28
2.3 LE CONTE VITALI IN PIASTRA.....	31
2.4 ARRICCHIMENTO ED ISOLAMENTO DELLE ENTEROBACTERIACEAE CARBAPENEME-RESISTENTI .....	32
2.5 TEST DI HODGE MODIFICATO .....	33
2.6 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC).....	34
2.6 L'ESTRAZIONE DEL DNA MICROBICO TOTALE.....	35
2.8 LA QUANTIFICAZIONE DEL DNA MICROBICO MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO .....	36
<b>3. RISULTATI</b> .....	<b>38</b>
3.1 ENUMERAZIONE DI ENTEROBACTERIACEAE.....	38
3.2 ISOLAMENTO E TEST QUALITATIVI (TEST DI HODGE MODIFICATO) E QUANTITATIVI (MIC) SUGLI ISOLATI .....	43
3.3 RESA DEL DNA MICROBICO TOTALE ESTRATTO .....	43
<b>4. CONCLUSIONI</b> .....	<b>46</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>47</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>50</b>

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 Principali bersagli molecolari dei farmaci antibatterici. Fonte: Antonelli et al. (2008). .....	6
Tabella 2 Elenco dei campioni analizzati.....	24
Tabella 3 Composizione del terreno MacConkey Agar .....	26
Tabella 4 Composizione del terreno Luria-Bertani.....	27
Tabella 5 Composizione terreno Mueller Hinton Agar.....	28
Tabella 6 Risultati delle analisi microbiologiche e test quali-quantitativi sugli isolati per verificare la resistenza ad ertapenem.....	38
Tabella 7 Risultati della quantificazione del DNA mediante spettrofotometro. ....	43

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 Anello $\beta$ -lattamico. ....	7
Figura 2 Struttura del Glican tetrapeptide. Fonte: Madigan et al. (2016). ....	7
Figura 3 Struttura base dei carbapenemi. Fonte: El-Gamal et al. (2017). ....	8
Figura 4 Distribuzione globale di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi e geni produttori di carbapenemasi negli allevamenti e nei frutti di mare. Fonte: Köck et al. (2018). ....	15
Figura 5 Geni produttori di carbapenemasi nei serbatoi ambientali. Il focus sono gli enzimi KPC, NDM, OXA e VIM. In questa mappa la quantificazione non è rappresentata, ma viene riportata la sola presenza o assenza del rispettivo gene a livello nazionale. Fonte: Mills e Lee (2019). ....	19
Figura 6 Distribuzione globale delle carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae, per paese e regione. Fonte: Logan et al. (2017). ....	21
Figura 7 Schema di analisi .....	30
Figura 8 Colonie cresciute su piastre MacConkey Agar con diverse diluizioni .....	32
Figura 9 Procedura del Test di Hodge Modificato .....	34
Figura 10 Distribuzione dei valori medi delle conte vitali espressi in log UFC/g. In blu i campioni di carne, in grigio di fegato, in arancione di feci, in giallo di reni e in verde di prodotto trasformato. ....	41
Figura 11 Distribuzione delle medie dei valori medi delle conte vitali espressi in log UFC/g divisi per tipologia di campione. In blu i campioni di carne, in grigio di fegato, in arancione di feci, in giallo di reni e in verde di prodotto trasformato. ....	42

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

DNA	Acido deossiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
DAP	Acido diaminopimelico
NAG	N-Acetilglucosamina
NAM	Acido N-Acilmuramico
PBP	Penicillin-binding proteins
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasi
GES	Guiana extended spectrum
IMI	Imipenem
NMC-A	Non-metallo carbapenemasi-A
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SFC	<i>Serratia fonticola</i> carbapenemasi
MDRO	Multi drug resistant organism
MBL	Metallo beta-lactamase
IMP	Active-on-imipenem
VIM	Verona integron MBL
NDM	New Delhi MBL
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase
CRE	Carbapenem resistant Enterobacteriaceae
CPE	Carbapenem producing Enterobacteriaceae
AR	Antibiotico resistenza
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase
CP	Carbapenemase producing
AMR	Resistenza antimicrobica
PSR	Programma di Sviluppo Rurale
SAF	Suine antibiotic free
D3A	Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali
UnivPM	Università Politecnica delle Marche
PCR	Reazione a catena della polimerasi
DiSVA	Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente
MIC	Concentrazione Minima Inibente
LB	Luria-Bertani
MH	Mueller Hinton
rpm	giri per minuto
UFC	Unità Formanti Colonia
MHT	Test di Hodge Modificato

# 1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

## 1.1 Antibiotici e carbapenemi

### 1.1.1 Definizione di antibiotico

I farmaci antibatterici sono prodotti di origine naturale o di sintesi che inibiscono la crescita batterica a concentrazioni che non risultano tossiche per l'organismo (tossicità selettiva) e che possono essere utilizzati per la chemioterapia delle infezioni batteriche. I prodotti di origine naturale sono detti antibiotici, mentre quelli ottenuti per sintesi chimica sono denominati chemioterapici. Alcuni sono generati per modificazioni chimiche di prodotti naturali ed in questo caso si dicono antibiotici semisintetici.

I farmaci antibatterici possono essere classificati anche secondo altri criteri. Dal punto di vista microbiologico la classificazione che viene generalmente seguita nella descrizione dei farmaci antibatterici è quella basata sul meccanismo di azione, che a sua volta dipende dalla struttura chimica della molecola.

L'azione antibatterica di ciascun farmaco dipende dall'interazione specifica con uno o più bersagli molecolari a livello della cellula batterica. I bersagli molecolari possono essere enzimi coinvolti nella biosintesi di strutture essenziali per la sopravvivenza e la crescita cellulare, substrati utilizzati in vie metaboliche essenziali, o componenti strutturali responsabili dell'integrità della cellula batterica.

L'interazione dei farmaci antibatterici con i rispettivi bersagli molecolari ha come conseguenza primaria un arresto della crescita batterica. In alcuni casi l'arresto è reversibile e la crescita può riprendere se il farmaco viene allontanato: in questi casi l'azione biologica del farmaco viene indicata come azione batteriostatica. In altri casi l'interazione del farmaco con il proprio bersaglio molecolare provoca un danno cellulare irreversibile e l'arresto della crescita è accompagnato dalla morte cellulare: in questi casi l'azione del farmaco viene indicata come azione battericida. L'attività batteriostatica o battericida dei farmaci dipende primariamente dalla natura dei farmaci e dalla loro modalità di interazione con il bersaglio, ma può anche essere influenzata dalla concentrazione del farmaco e dalla specie batterica.

I principali bersagli molecolari dei farmaci antibatterici sono: enzimi o substrati coinvolti nella sintesi del peptidoglicano, membrana plasmatica batterica, DNA topoisomerasi di tipo II, RNA polimerasi, ribosoma batterico e altri fattori coinvolti nella sintesi proteica, enzimi coinvolti nella sintesi dei folati. In base al bersaglio molecolare, si distinguono rispettivamente le seguenti classi di antibatterici:

Fosfomicina, Glicopeptidi e  $\beta$ -lattamici; Peptidi e lipopeptidi ciclici; Chinoloni e Novobiocina; Ansamicine; Aminoglicosidi, Oxazolidinoni, Tetracicline, Fenicoli, Macrolidi, Lincosamidi, Streptogramine, Mupirocina e Acido fusidico; Sulfamidici e Trimetoprim (Antonelli et al., 2008).

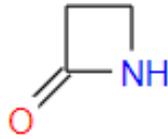
**Tabella 1 Principali bersagli molecolari dei farmaci antibatterici. Fonte: Antonelli et al. (2008).**

<b>Bersaglio molecolare</b>	<b>Principali classi di farmaci</b>
Enzimi o substrati coinvolti nella sintesi del peptidoglicano	Fosfomicina Glicopeptidi $\beta$ -lattamici
Membrana plasmatica batterica	Peptidi e lipopeptidi ciclici
DNA topoisomerasi di tipo II	Chinoloni Novobiocina
RNA polimerasi	Ansamicine
Ribosoma batterico e altri fattori coinvolti nella sintesi proteica	Aminoglicosidi Oxazolidinoni Tetracicline Fenicoli Macrolidi Lincosamidi Streptogramine Mupirocina Acido fusidico
Enzimi coinvolti nella sintesi dei folati	Sulfamidici Trimetoprim

### 1.1.2 Antibiotici carbapenemi e meccanismo d'azione

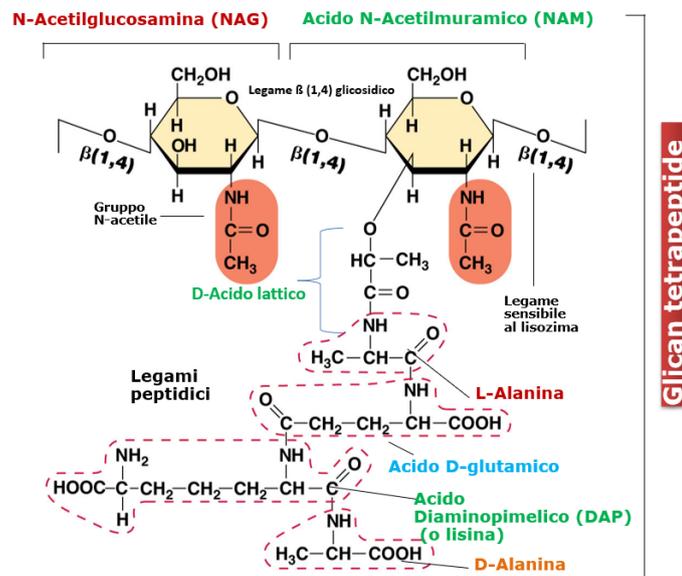
I carbapenemici sono importanti antibiotici ad ampio spettro, diffusamente prescritti e attivi contro la maggior parte dei batteri aerobi e anaerobi Gram-positivi e Gram-negativi, eccetto gli stafilococchi oxacillino e meticillino-resistenti, alcune Enterobacteriaceae e alcuni batteri gram-negativi (tra cui batteri del genere *Pseudomonas*) e pertanto rappresentano l'ultima linea terapeutica contro le infezioni da questi microrganismi (Murray et al., 2010).

I carbapenemi fanno parte di una ampia classe di antibiotici, denominati  $\beta$ -lattamici, perché hanno in comune una struttura formata da un anello  $\beta$ -lattamico.



**Figura 1 Anello  $\beta$ -lattamico.**

Questa classe di antibatterici agisce sulla parete batterica, in particolare sullo strato di peptidoglicano; un polisaccaride costituito da due amino zuccheri, l'*N*-acetilglucosamina e l'acido *N*-acetilmuramico, e da pochi aminoacidi rappresentati da *L*-alanina, *D*-alanina, acido *D*-glutammico e da *L*-lisina o acido diaminopimelico (DAP). Questi costituenti sono assemblati in modo da formare un'unità strutturale di ripetizione, il glicantetrapeptide. Le singole catene sono tenute insieme da legami crociati tra *D*-alanina e DAP, che donano rigidità alla struttura (Madigan et al., 2016).



**Figura 2 Struttura del Glican tetrapeptide. Fonte: Madigan et al. (2016).**

L'anello  $\beta$ -lattamico ha una somiglianza strutturale con il dipeptide *D*-alanil-*D*-alanina, con il quale compete per la transpeptidasi, enzima responsabile della formazione dei legami crociati tra le catene del peptidoglicano. A differenza del substrato naturale, l'anello  $\beta$ -lattamico lega covalentemente l'enzima e lo inattiva irreversibilmente. Questo attiva a sua volta le autolisine che degradano la parete cellulare causando la morte della cellula batterica. Pertanto, gli antibiotici  $\beta$ -lattamici agiscono generalmente come battericidi.

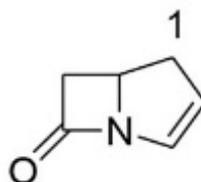
Per la capacità di legare gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, gli enzimi bersaglio di questi farmaci sono anche detti proteine leganti la penicillina (penicillin-binding proteins, PBP). L'anello  $\beta$ -lattamico è un nucleo versatile, che può essere incluso in diversi tipi di strutture chimiche per ottenere composti ad attività antibatterica. Ciò ha permesso lo sviluppo di un gran numero di farmaci  $\beta$ -lattamici, che si differenziano tra di loro per spettro di attività antibatterica. Le principali sottofamiglie di  $\beta$ -lattamici sono:

- le penicilline;
- le cefalosporine;
- i carbapenemi (ad es. imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem);
- i monobattami.

Per efficacia e versatilità gli antibiotici  $\beta$ -lattamici sono tra i farmaci antibatterici più utilizzati in terapia (Antonelli et al., 2008).

Le penicilline sono state ampiamente utilizzate per il trattamento di infezioni gravi da quasi 60 anni grazie alla loro eccellente efficacia e sicurezza e ai profili di tollerabilità. Ciò ha portato all'emergere di resistenze batteriche, principalmente attraverso le  $\beta$ -lattamasi, che ne minacciavano l'uso clinico. Per questo motivo, gli scienziati hanno iniziato a cercare inibitori delle  $\beta$ -lattamasi. Nel 1976, gli scienziati hanno scoperto il primo inibitore della  $\beta$ -lattamasi, generato da batteri Gram-positivi, chiamato acido olivanico. Tuttavia, a causa della sua scarsa stabilità e della scarsa capacità di penetrare nelle cellule batteriche, gli scienziati hanno perso il loro interesse per questo prodotto. Dopodiché, la ricerca di altri inibitori delle  $\beta$ -lattamasi è ricominciata e si è conclusa con due agenti: l'acido clavulanico e la tienamicina. La tienamicina è stato il primo carbapeneme ad essere prodotto ed è considerato il composto principale per i carbapenemi (El-Gamal et al., 2017).

Dal punto di vista strutturale, i carbapenemi sono derivati  $\beta$ -lattamici che contengono un anello  $\beta$ -lattamico fuso con un anello a 5 atomi, che differisce da quello delle penicilline perché insaturo e con un atomo di carbonio anziché un atomo di zolfo (Brunton et al., 2019). Questo carbonio è importante per la potenza, lo spettro di attività e la stabilità dei carbapenemi contro le  $\beta$ -lattamasi.



**Figura 3** Struttura base dei carbapenemi. Fonte: El-Gamal et al. (2017).

Lo spettro di attività di questa classe di antibiotici è più ampio rispetto alle combinazioni di penicilline, cefalosporine e inibitori della  $\beta$ -lattamasi disponibili (El-Gamal et al., 2017).

I carbapenemi vengono classificati secondo il seguente schema:

- Gruppo 1: ad ampio spettro, con attività limitata contro i bacilli Gram-negativi non fermentanti (es. ertapenem);
- Gruppo 2: ad ampio spettro, con attività contro i bacilli Gram-negativi non fermentanti (es. imipenem, meropenem e doripenem);
- Gruppo 3: con attività clinica contro *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), ancora in fase di sviluppo.

In generale, i carbapenemi tendono ad avere una migliore stabilità contro gli enzimi  $\beta$ -lattamasi rispetto ad altri antibiotici  $\beta$ -lattamici. Ad esempio, tendono ad essere altamente attivi contro le Enterobacteriaceae produttrici di  $\beta$ -lattamasi. Tuttavia, diverse specie batteriche sono in grado di resistere alla loro attività mediante diversi meccanismi (El-Gamal et al., 2017).

## 1.2 Antibiotico-resistenza

### 1.2.1 Principali meccanismi di resistenza agli antibiotici

La farmacoresistenza è uno stato di insensibilità o di ridotta sensibilità ai farmaci che normalmente causano inibizione o morte cellulare. Il termine è usato abitualmente in riferimento a microrganismi o a popolazioni di cellule neoplastiche (Pratt e Taylor, 1998). Molte infezioni batteriche che fino a pochi anni fa potevano essere curate con antibiotici specifici sono oggi resistenti ad esse. Si tratta di un fenomeno generale, poiché è stato osservato in diverse parti del mondo, in tempi diversi, e per quasi tutti gli antibiotici, pertanto, la sua rilevanza clinica è evidente (Lancini et al., 1995).

Oggi, ogni classe principale di antibiotici è associata all'insorgenza di una resistenza significativa. Due fattori principali sono associati all'insorgenza della resistenza agli antibiotici: l'evoluzione e le pratiche cliniche ambientali. Quando una specie microbica è soggetta a una minaccia esistenziale, chimica o di altra natura, questa pressione selezionerà delle mutazioni casuali nel genoma della specie tali da consentirne la sopravvivenza (Brunton et al., 2019).

I batteri possono essere intrinsecamente resistenti a determinati antibiotici, ma possono anche acquisire resistenza agli antibiotici, tramite mutazioni spontanee nei geni cromosomici (resistenza di tipo cromosomiale) e tramite trasferimento genico orizzontale (resistenza di tipo plasmidico).

La resistenza intrinseca di una specie batterica a un particolare antibiotico è la capacità di resistere all'azione di quell'antibiotico come risultato di caratteristiche strutturali o funzionali intrinseche e si traduce nello spettro d'azione dell'antibiotico (Blair et al., 2015).

Oltre alla resistenza intrinseca, i batteri possono acquisire resistenza agli antibiotici, sviluppando quindi una resistenza acquisita (Blair et al., 2015). In questo caso si può parlare di resistenza passiva, quando i batteri agiscono modificando se stessi (un enzima, un carrier, una subunità ribosomiale), oppure attiva, quando i batteri producono enzimi, intracellulari o extracellulari, degradando l'antibiotico.

I meccanismi della resistenza si possono dividere in tre gruppi principali: i) quelli che riducono al minimo le concentrazioni intracellulari dell'antibiotico, a causa della scarsa penetrazione nel batterio o dell'efflusso dell'antibiotico; ii) quelli che modificano il bersaglio antibiotico per mutazione genetica o modificazione post-traduzionale del bersaglio e, iii) quelli che inattivano l'antibiotico mediante idrolisi o modifica (Blair et al., 2015).

La resistenza agli antimicrobici può svilupparsi in uno qualsiasi o in più passaggi del processo tramite cui un farmaco raggiunge e si combina con il suo bersaglio. Dunque, lo sviluppo della resistenza si può sviluppare a causa di:

- entrata ridotta di antibiotico nel patogeno;
- esportazione di antibiotico da parte di pompe di efflusso;
- rilascio di enzimi che alterano o distruggono l'antibiotico;
- alterazione di proteine bersaglio;
- sviluppo di vie alternative a quelle inibite dall'antibiotico.

(Brunton et al., 2019)

Entrata ridotta di antibiotico nel patogeno per riduzione della permeabilità: la membrana esterna dei batteri Gram-negativi è una barriera semipermeabile che esclude grosse molecole polari dall'ingresso nella cellula. Le molecole polari piccole, tra cui molti antibiotici, entrano nella cellula attraverso proteine canale chiamate porine. L'assenza, la mutazione o la perdita di una porina preferenziale può rallentare la velocità di entrata del farmaco in una cellula o prevenirne del tutto l'entrata, riducendo efficacemente la concentrazione del farmaco nel sito bersaglio (Brunton et al., 2019).

Esportazione di antibiotico da parte di pompe di efflusso: le pompe di efflusso batterico trasportano attivamente molti antibiotici fuori dalla cellula. Se sovraesprese, le pompe di efflusso possono anche conferire elevati livelli di resistenza ad antibiotici precedentemente clinicamente utili. Alcune pompe di efflusso hanno una specificità del substrato ristretta, ma molte trasportano un'ampia gamma di substrati strutturalmente dissimili e sono note come pompe di efflusso multiresistenti (Blair et al., 2015).

Alterazione o distruzione dell'antibiotico: l'inattivazione degli antibiotici catalizzata da enzimi è un importante meccanismo di resistenza agli antibiotici che è stato rilevante sin dal primo utilizzo di antibiotici, con la scoperta della penicillinasi (una  $\beta$ -lattamasi), nel 1940 (Blair et al., 2015). Coerentemente con il primato degli antibiotici  $\beta$ -lattamici in medicina (penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattami), le  $\beta$ -lattamasi sono tra gli enzimi di resistenza più diffusi e clinicamente importanti (Wright, 2011). Sono noti due distinti meccanismi chimici: inattivazione degli antibiotici per idrolisi o inattivazione dell'antibiotico per trasferimento di un gruppo chimico (Blair et al., 2015).

Alterazione di proteine bersaglio: una conseguenza comune di mutazioni puntiformi singole o multiple è un cambiamento della composizione amminoacidica e della conformazione della proteina bersaglio di un antimicrobico. Questo cambiamento può portare a una ridotta affinità del farmaco per il suo bersaglio, che si traduce in resistenza all'antibiotico. Tali alterazioni possono essere dovute alla mutazione del bersaglio naturale, alla modificazione del bersaglio o all'acquisizione di una forma resistente dal bersaglio sensibile nativo (Hooper, 2002; Lim e Strynadka, 2002; Nakajima, 1999) (Brunton et al., 2019).

### 1.2.2 Resistenza ai carbapenemi

Molti batteri Gram-negativi non fermentanti (es. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), così come le Enterobacteriaceae (es., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp.) e batteri Gram-positivi (es., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.), sono o stanno diventando resistenti alla maggior parte dei carbapenemi clinicamente disponibili (Papp-Wallace et al., 2011). La diffusione globale dei batteri che mostrano resistenza ai carbapenemi rappresenta una minaccia per la salute pubblica (umana e animale), poiché questi hanno un ampio spettro di attività contro i batteri Gram-negativi e sono usati come una delle ultime linee di terapia antibiotica, anche contro le infezioni multiresistenti, specialmente nei casi di infezione da organismi produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (Macareño-Castro et al., 2022; Kelly et al., 2017; Mills e Lee, 2019; Roschanski et al., 2017; Armin et al., 2021; Bonardi e Pitino, 2019; Pulss et al., 2017; Schrijver et al., 2018). Tale resistenza è associata a significative conseguenze cliniche ed economiche, tra cui una degenza ospedaliera più lunga, costi sanitari più elevati e un aumento dei tassi di mortalità (Sleiman et al., 2021; Tilahun et al., 2021; Mills e Lee, 2019; Kelly et al., 2017; Macareño-Castro et al., 2022).

Sfortunatamente, la resistenza ai carbapenemi è stata sempre più segnalata tra i batteri Gram-negativi (Blair et al., 2014). In particolare, questa tendenza è evidenziata nella famiglia delle Enterobacteriaceae (Bonardi e Pitino, 2019) provenienti da diverse aree geografiche del mondo (Armin et al., 2021).

I batteri mostrano resistenza ai carbapenemi attraverso diversi meccanismi: la produzione di  $\beta$ -lattamasi (carbapenemasi), pompe di efflusso e mutazioni che alterano l'espressione o la funzione delle porine e delle

PBP (Papp-Wallace et al., 2011; Bonardi e Pitino, 2019). Combinazioni di questi meccanismi possono causare elevati livelli di resistenza ai carbapenemi in alcune specie batteriche, come *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Papp-Wallace et al., 2011).

La produzione di  $\beta$ -lattamasi specifiche, dette carbapenemasi, è la più importante per conferire resistenza ai carbapenemi. Infatti, le carbapenemasi sono in grado di idrolizzare i carbapenemi in modo efficiente, mentre la maggior parte delle altre  $\beta$ -lattamasi li idrolizzano molto lentamente (Temkin et al., 2014). Inoltre, le carbapenemasi idrolizzano un'ampia varietà di  $\beta$ -lattamici, tra cui cefalosporine, penicilline e aztreonam (Bonardi e Pitino, 2019).

Le carbapenemasi sono classificate in base alla loro struttura molecolare e appartengono a 3 classi di  $\beta$ -lattamasi: classe A, B e D del sistema di classificazione Ambler. Le  $\beta$ -lattamasi di classe A e D richiedono serina nel loro sito attivo, mentre le  $\beta$ -lattamasi di classe B richiedono zinco per l'idrolisi  $\beta$ -lattamica (Logan e Weinstein, 2017; Papp-Wallace et al., 2011). Le  $\beta$ -lattamasi di classe C di Ambler, al contrario, possiedono un'attività leggermente estesa nei confronti dei carbapenemi, ma idrolizzano principalmente le cefalosporine (AmpC) (Bonardi e Pitino, 2019).

Importanti geni di carbapenemasi di classe A sono *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi (KPC), Guiana a spettro esteso (GES), imipenem resistenti (IMI), non metallo-carbapenemasi-A (NMC-A), enzima *Serratia marcescens* (SME) e carbapenemasi *Serratia fonticola* (SFC). I KPC sono i geni trasmissibili di classe A più comuni che circolano nelle Enterobacteriaceae in tutto il mondo. Questi sono in grado di idrolizzare tutti i  $\beta$ -lattamici e spesso i ceppi che ospitano *bla<sub>KPC</sub>* hanno acquisito resistenza ai fluorochinoloni, agli aminoglicosidi e al trimetoprim-sulfametossazolo, creando MDRO (Logan e Weinstein, 2017).

Le metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) di classe B sono un gruppo complesso di enzimi che idrolizzano tutti i  $\beta$ -lattamici, salvo i monobattami e non sono inibiti dagli inibitori della  $\beta$ -lattamasi disponibili in commercio. Differiscono dalle carbapenemasi di serina nel fabbisogno di zinco per l'idrolisi  $\beta$ -lattamica; quindi, la loro attività è inibita da agenti chelanti metallici. Notevoli geni MBL trasmissibili nelle Enterobacteriaceae includono IMP (attivo su imipenem), VIM (MBL codificata con integrone di Verona) e NDM (New Delhi MBL).

Le OXA  $\beta$ -lattamasi di classe D, sono un gruppo diversificato ed eterogeneo di enzimi presenti nelle specie *Acinetobacter* e, sempre più spesso, in particolare le varianti OXA-48, nelle Enterobacteriaceae (Logan e Weinstein, 2017).

L'enzima OXA-48 è una  $\beta$ -lattamasi di classe D con elevata attività contro le penicilline, ma debole attività contro cefalosporine e carbapenemi a spettro espanso (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2006). Rappresenta la carbapenemasi più comunemente rilevata in tutto il mondo (Nordmann et al., 2011) e i ceppi produttori di

OXA-48 portano comunemente geni ESBL che conferiscono anche resistenza alle cefalosporine a spettro espanso (Temkin et al., 2014) (Bonardi e Pitino, 2019).

### **1.3 Serbatoi di resistenza ai carbapenemi**

I geni produttori di carbapenemasi e batteri resistenti ai carbapenemi sono stati segnalati nell'ambiente in quasi tutti i continenti. Le acque reflue ospedaliere e municipali, l'acqua potabile, i corsi d'acqua naturali, gli animali da compagnia, la fauna selvatica, gli ambienti agricoli, gli allevamenti ed i prodotti alimentari al dettaglio sono stati identificati come attuali serbatoi di batteri resistenti ai carbapenemi e geni produttori di carbapenemasi (Mills e Lee, 2019).

Le infezioni da Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi o “carbapenem resistant Enterobacteriaceae” (CRE) possono derivare naturalmente da batteri presenti nel tratto intestinale di una persona sana, nonché da suolo, acqua, liquami, piante (frutta, verdura ed erbe), latticini e carne cruda (Tilahun et al., 2021).

La resistenza agli antibiotici è spesso concentrata intorno agli ospedali e la diffusione di CRE associata all'assistenza sanitaria è già considerata endemica in alcune regioni (Ray et al., 2016; Satlin et al., 2017; Kumarasamy et al., 2010). È stato dimostrato che l'ambiente ospedaliero ospita e diffonde AR. I batteri resistenti vengono rilasciati nell'ambiente attraverso le acque reflue ospedaliere, anche se adeguatamente trattate (Mills e Lee, 2019).

Un altro possibile serbatoio di diffusione riguarda gli animali, in particolare fauna selvatica e animali da compagnia.

La via di trasmissione non è ben definita, ma è stato proposto che gli animali possano essere in grado di trasmettere geni AR o batteri all'uomo (Guerra et al., 2014). La più grande preoccupazione riguardo gli animali portatori di CRE, è che i carbapenemi sono vietati in ambito animale, il che significa che è improbabile che questi animali abbiano acquisito resistenza dall'esposizione diretta ai carbapenemi. Tali resistenze in animali da compagnia e da allevamento possono derivare dalla diffusione di geni di resistenza e batteri resistenti ai carbapenemi tra ecosistemi diversi ma collegati, quali suolo, acque, allevamenti, ospedali, comunità umana. Tali ambienti diventano dei serbatoi di diffusione di resistenze a questi antibiotici fino a ritornare all'uomo con la dieta. Il gene più diffuso che produce carbapenemasi negli animali è OXA, che potrebbe indicare che questo gene ha un potenziale maggiore di trasmissione (Mills e Lee, 2019).

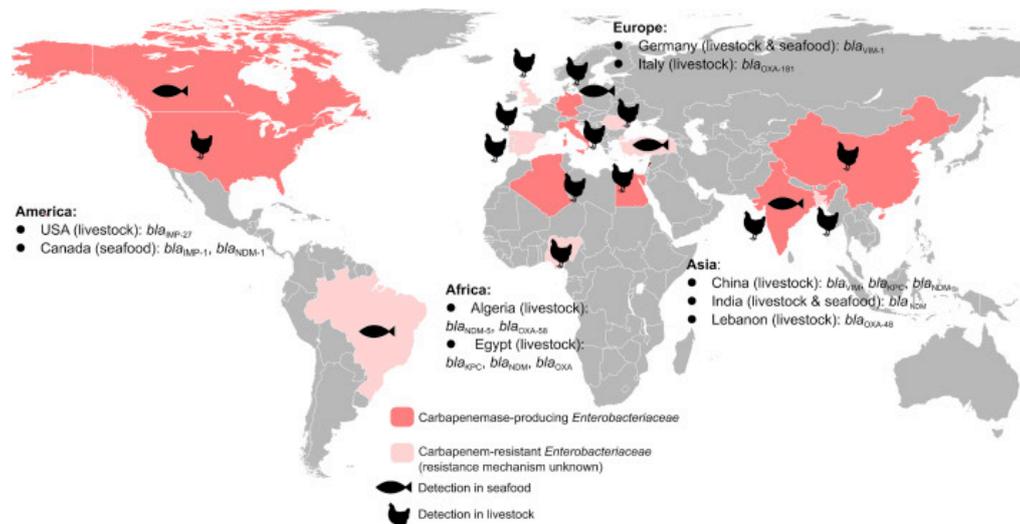
### 1.3.1 Resistenza ai carbapenemi negli allevamenti

Mentre negli isolati clinici da infezioni umane è stata rilevata un'ampia varietà di carbapenemasi, a causa della mancanza di studi di sorveglianza più ampi, l'attuale frequenza della comparsa di queste negli allevamenti e negli ambienti associati è poco conosciuta. Tuttavia, le indagini negli ultimi anni hanno indicato la presenza di carbapenemasi negli allevamenti e nelle fattorie circostanti (Fischer et al., 2012, Fischer et al., 2013a) (Roschanski et al., 2017).

In Europa, le autorità sanitarie e i medici si sono allarmati quando nel 2012 sono stati segnalati casi di CRE negli allevamenti di suini tedeschi, così come negli animali da compagnia (Köck et al., 2018). I primi rapporti hanno recentemente descritto la presenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nel bestiame, nella fauna selvatica e negli animali domestici. Questi risultati hanno sollevato la questione se i batteri resistenti ai carbapenemi siano più ampiamente diffusi tra gli allevamenti tedeschi (Roschanski et al., 2017).

Nonostante in medicina veterinaria i carbapenemi non siano approvati negli allevamenti, studi su ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) e ceppi di *Escherichia coli* produttore di  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) hanno dimostrato che questi batteri multiresistenti sono spesso trasmessi tra animali domestici e i loro proprietari e allo stesso modo gli animali di allevamento e gli operatori degli allevamenti o veterinari (Köck et al., 2018). La presenza di batteri produttori di carbapenemasi negli animali da produzione alimentare è stata segnalata da diversi paesi e da tale analisi risulta che suini e polli rappresentano le specie in cui la resistenza ai carbapenemi da parte di Enterobacteriaceae e microrganismi non fermentanti è stata più frequentemente osservata. Diverse classi di carbapenemasi sono state trovate sia nelle Enterobacteriaceae che nei batteri non fermentanti isolati dagli animali da allevamento (Patel e Bonomo, 2013; Bonardi e Pitino, 2019).

Negli ambienti agricoli sono stati anche scoperti alcuni di questi geni di resistenza ai carbapenemi: VIM è stato riscontrato da un allevamento di suini in Germania, IMP da un allevamento di suini negli Stati Uniti e KPC da un allevamento ittico nella provincia del Guangdong, in Cina (Fischer et al., 2012, Mollenkopf et al., 2016, Klase et al., 2019). Nel dettaglio, il gene NDM è stato riscontrato anche da vacche da latte in Cina (He et al., 2017). OXA è stato trovato in suinetti in India, polli in Algeria, bovini in Francia, maiali, pollame e bovini in Libano e in vitelli, polli da carne e maiali nei Paesi Bassi (Nirupama et al., 2018; Chabou et al., 2018, Poirel et al., 2012, Al Bayssari et al., 2015, Ceccarelli et al., 2017). Il gene *bla<sub>VIM</sub>* è stato isolato anche da maiali, pollame e bovini in Libano (Al Bayssari et al., 2015) (Mills e Lee, 2019).



**Figura 4** Distribuzione globale di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi e geni produttori di carbapenemasi negli allevamenti e nei frutti di mare. Fonte: Köck et al. (2018).

I suini e la carne di maiale sono stati identificati come fonte di carbapenemasi, come OXA-48, KPC-2, VIM e NDM-5. L'emergere di tali ceppi è estremamente preoccupante. L'attuale scoperta di un ceppo di *E. coli* proveniente da un allevamento italiano che ospita i geni *mcr-1*, *bla<sub>OXA-181</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>* e *armA*, insieme a un recente rapporto di un isolato di pollo dalla Cina che trasportava *mcr-1* e *bla<sub>NDM-5</sub>*, suggerisce che gli allevamenti possano diventare importanti serbatoi di ceppi che conferiscono resistenza a un certo numero di antibiotici che sono l'ultima linea terapeutica, comprese le polimixine, i carbapenemi e le cefalosporine di terza generazione (Pulss et al., 2017).

La prima rilevazione di microrganismi produttori di carbapenemasi nei suini risale al 2011, quando un ceppo di *E. coli* produttore di VIM-1 è stato isolato da un allevamento di suini in Germania (Fischer et al., 2012). Tale ceppo era resistente alla penicillina, alle cefalosporine, alla cefamicina e all'amoxicillina/acido clavulanico, ma era sensibile all'aztreonam e intermedio-sensibile ai carbapenemi (imipenem, ertapenem e meropenem). Mediante PCR, è stato riscontrato che l'isolato ospitava sia il gene codificante Amp *bla<sub>ACC-1</sub>* che il gene codificante la carbapenemasi VIM-1. Il ceppo tedesco di *E. coli* produttore di VIM-1 rappresentava il primo microrganismo produttore di carbapenemasi isolato dai suini in Europa, ma il suo tipo di sequenza (ST88) era stata precedentemente identificata anche tra polli, bovini e umani in Germania (Fischer et al., 2012). Nel 2011-2012, un altro studio tedesco ha rivelato la presenza di *Salmonella Infantis* che produce VIM-

1 da due allevamenti di suini e un allevamento di polli da carne (Fischer et al., 2013a ). Gli isolati portavano sia il gene *bla*<sub>ACC-1</sub> che il gene *bla*<sub>VIM-1</sub>.

Nel 2015 un ceppo di *E. coli* produttore dell'enzima VIM-1 è stato segnalato dai suini dalla Germania, confermando così la persistenza di *E. coli* produttore di VIM-1 nella popolazione suina tedesca per almeno quattro anni (Irrgang et al., 2016). Inoltre, un ceppo *E. coli* produttore di carbapenemasi è stato isolato da carne suina in Belgio (EFSA ed ECDC, 2017b). Recentemente è stata segnalata la presenza di *bla*<sub>OXA-181</sub> in ceppi di *E. coli* isolati da due maiali allevati in un allevamento italiano (Pulss et al., 2017). Negli Stati Uniti è stata segnalata anche la presenza di geni codificanti carbapenemasi trasmessi da plasmidi tra Enterobacteriaceae nei suini (Bonardi e Pitino, 2019).

La presenza di geni che codificano per la resistenza agli antimicrobici frequentemente utilizzati nella produzione suina (es. sulfamidici, cefalosporine) potrebbe essere favorita da concentrazioni selettive minime degli agenti antimicrobici. Pertanto, anche una concentrazione di farmaco molto bassa che si trova negli ambienti zootecnici e negli esseri umani e negli animali trattati potrebbe essere sufficientemente alta per selezionare e mantenere i plasmidi portatori di resistenza nelle popolazioni batteriche (Gullberg et al., 2014).

Uno studio sperimentale ha valutato l'uso di amoxicillina ed ertapenem in modelli suini; ogni antimicrobico ha provocato cambiamenti nel microbioma intestinale dei suini causando l'eliminazione dei batteri commensali chiave e la propagazione dei geni di resistenza agli antibiotici ("antimicrobial resistance", AMR), comprese le  $\beta$ -lattamasi. In particolare, l'amoxicillina ha promosso la selezione di molti geni AMR, pompe di efflusso e  $\beta$ -lattamasi, mentre l'uso di ertapenem ha innescato l'emergere di geni che codificano per  $\beta$ -lattamasi e la carbapenemasi *bla*<sub>IMP-27</sub> (Connelly et al., 2018; Bonardi e Pitino, 2019).

L'associazione tra l'uso di antibiotici negli animali e lo sviluppo della resistenza nei batteri commensali è stata chiaramente descritta, ma, ancora più preoccupante, è la trasmissione di batteri resistenti dagli animali destinati alla produzione alimentare all'uomo (Schrijver et al., 2018). Attualmente, le CPE negli animali sono rare, tuttavia, la scoperta di ceppi resistenti con un'origine animale sottolinea che questi batteri rappresentano un serio problema di salute pubblica (Pulss et al., 2017) e che la prevenzione della diffusione delle CRE nella fauna selvatica, negli animali da produzione alimentare e negli animali da compagnia dovrebbe essere una delle principali priorità della salute pubblica per proteggere sia le persone con esposizione diretta che i consumatori (Köck et al., 2018).

### *1.3.2 Epidemiologia e trasmissione delle resistenze agli antibiotici tra animali e tra animali e uomo*

A causa dell'elevato utilizzo di antibiotici in tutti gli ambiti, dell'agricoltura intensiva e della globalizzazione, la trasmissione dell'AMR dagli animali di allevamento all'uomo rappresenta oggi un grave rischio (Schrijver et al., 2018).

Le Enterobacteriaceae resistenti ai farmaci e i geni di resistenza possono diffondersi in vari modi, a seconda della persistenza del batterio nell'ambiente, della virulenza e del dosaggio infettivo. Il contatto con pazienti colonizzati, aria, acqua, cibo, bevande e attrezzature contaminate possono diffondere tali resistenze. Inoltre, l'aumento della mobilità, i cambiamenti ambientali, il sovraffollamento, la scarsa pulizia e la cattiva gestione delle infezioni stanno contribuendo ad aumentare il tasso di trasmissione (Tilahun et al., 2021).

A causa del loro uso nell'allevamento, gli antimicrobici possono depositarsi nel letame applicato al suolo nelle pratiche agricole. Oltre a questo, i batteri AMR rilasciati dagli animali possono contaminare le aree agricole. In questo modo, sia gli antimicrobici che i batteri AMR possono passare dal suolo e raggiungere le acque superficiali, contribuendo quindi alla contaminazione del suolo, delle colture e degli animali selvatici (Laxminarayan et al., 2013). A loro volta, gli animali selvatici possono entrare in stretto contatto con liquami e rifiuti, portando così a un'ampia diffusione di batteri AMR e geni di resistenza, con conseguenze dannose per l'intero ecosistema (Pesapane et al., 2013; Bonardi e Pitino, 2019). I batteri che trasportano geni resistenti altamente trasferibili sono fonte di preoccupazione, perché gli elementi mobili potrebbero raggiungere un'ampia varietà di ambienti in cui sono presenti altre specie batteriche. Ad esempio, l'uso dell'acqua proveniente da fiumi inquinati in agricoltura e acquacoltura aumenta il rischio che i batteri AMR si diffondano nella catena alimentare (EFSA, 2013). Pertanto, quando i batteri AMR e i loro geni sono portati ad animali da produzione alimentare il rischio di potenziale contaminazione dei loro prodotti derivati non dovrebbe essere ignorato (EFSA, 2013) (Bonardi e Pitino, 2019).

È stata dimostrata la prevalenza di CRE negli ambienti naturali con cui gli esseri umani interagiscono. Le esatte vie di trasmissione dell'AR all'uomo sono ancora sconosciute, e i casi confermati di infezione umana tramite batteri AR ambientali sono scarsi. I due principali percorsi di esposizione sono l'ingestione di acqua potabile contaminata, ingestione di prodotti di origine animale e il contatto fisico con gli animali, l'ambiente stesso o le superfici contaminate (Harbarth et al., 2015). In caso di infezione, non è chiaro se questa sia il risultato di geni AR o batteri dell'ambiente, poiché lo scambio genico potrebbe avvenire sia nell'ambiente che nell'ospite, umano o animale, con il proprio microbiota.

Una visione d'insieme è quindi essenziale per comprendere le vie di trasmissione della antibiotico resistenze dall'ambiente, agli animali e all'uomo e viceversa (Mills e Lee, 2019).

I geni di resistenza possono essere trasmessi anche da batteri che non sono resistenti agli antibiotici. Possono essere trasmessi tra batteri della stessa specie e batteri di specie o generi diversi. La trasduzione, la trasformazione e la coniugazione sono esempi di meccanismi di trasferimento genico orizzontale. I plasmidi, i trasposoni e altri vettori possono trasportare uno o più geni di resistenza. Determinanti di resistenza per altre classi di antimicrobici, come aminoglicosidi e fluorochinoloni, possono essere veicolati da ESBL e plasmidi che esprimono carbapenemasi. Per i geni

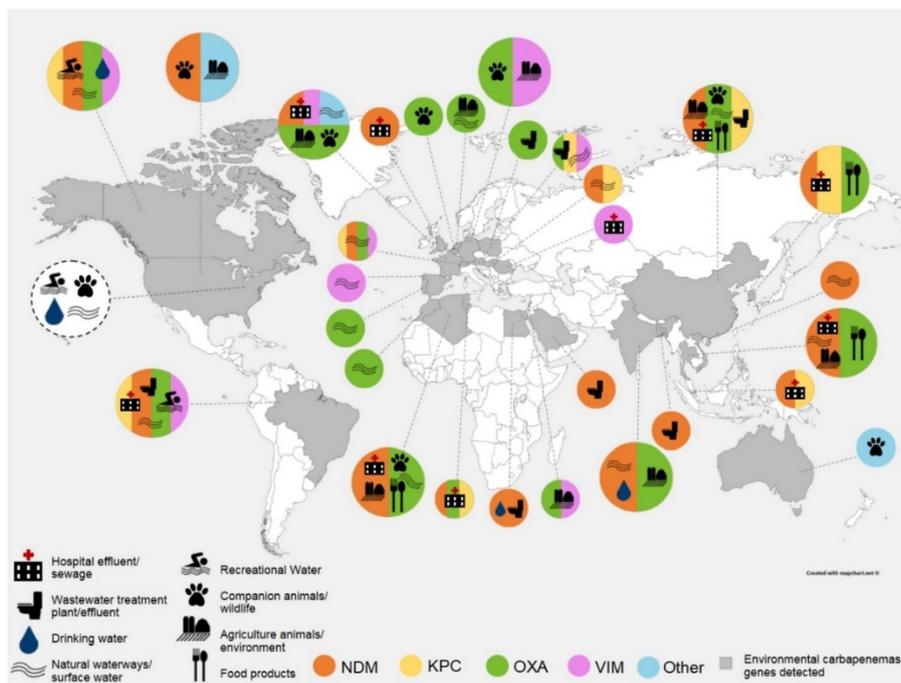
ESBL nelle famiglie delle Enterobacteriaceae, è stata osservata la possibilità di trasmissione orizzontale del gene di resistenza, mediata da plasmidi, tra bestiame e esseri umani (ad esempio, attraverso la catena alimentare) (Tilahun et al., 2021).

Secondo dati epidemiologici, diverse Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi stanno diventando sempre più diffuse in diverse parti del mondo. I ceppi resistenti ai carbapenemi furono inizialmente scoperti negli anni '80 e si diffusero rapidamente in tutto il mondo. In generale, tutti i paesi sono a rischio di infezioni da Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi, con prevalenza crescente in tutto il mondo (Tilahun et al., 2021).

Gran parte dell'aumento della resistenza ai carbapenemi è stato attribuito alla rapida diffusione dei determinanti genetici trasmessi da plasmidi che codificano per le  $\beta$ -lattamasi. Sebbene non tutte le carbapenemasi conferiscano resistenza ai carbapenemi, molti sono in grado di idrolizzare tutti gli antibiotici  $\beta$ -lattamici.

Un numero crescente di Enterobacteriaceae è segnalato come portatore frequente di geni che codificano per due preoccupanti sottoclassi di carbapenemasi: *K. pneumoniae* carbapenemasi (KPC) (che è diventata endemica in alcune parti delle Americhe, dell'Europa meridionale, Israele e Cina) e la metallo- $\beta$ -lattamasi di Nuova Delhi (NDM), che è diventata endemica nell'Europa settentrionale e nella regione dell'Asia del Pacifico ed in particolare nel Regno Unito e in India. OXA-48 è la terza carbapenemasi più diffusa a livello globale, trovata più spesso in Nord Africa e in Europa.

Oltre all'NDM, le metallo- $\beta$ -lattamasi VIM e IMP, anche se meno comuni, sono ugualmente preoccupanti a causa dei meccanismi di trasmissione simili (Kelly et al., 2017). OXA-181 è emerso inizialmente tra i CPE nel subcontinente indiano nel 2007, ma da allora si è diffuso in molti altri paesi. OXA-48 e OXA-181 sono emersi sempre di più negli esseri umani, ma raramente negli animali. OXA-48 è stato identificato in Enterobacteriaceae da cani e gatti in diversi paesi, come la Germania e gli Stati Uniti, in *E. coli* isolato da pollame in Libano e in *E. coli* da bovini da latte in Egitto (Pulss et al., 2017).



**Figura 5** Geni produttori di carbapenemasi nei serbatoi ambientali. Il focus sono gli enzimi KPC, NDM, OXA e VIM. In questa mappa la quantificazione non è rappresentata, ma viene riportata la sola presenza o assenza del rispettivo gene a livello nazionale. Fonte: Mills e Lee (2019).

Come noto, l'uso di antimicrobici porta ad una pressione selettiva per i ceppi resistenti sia nell'uomo che negli animali (Woodford et al., 2014). Ad esempio, il rilevamento di batteri resistenti ai carbapenemi negli animali da produzione alimentare può essere dovuto all'uso di cefalosporine ad ampio spettro negli allevamenti. L'esatta relazione tra uso di cefalosporine ad ampio spettro e resistenza ai carbapenemi non è stata completamente stabilita (Mollenkopf et al., 2017), anche se plasmidi portatori di geni che conferiscono sia resistenza ai carbapenemi ( $bla_{VIM-1}$ ) che alle cefalosporine di terza generazione ( $bla_{ACC-1}$ ) sono stati recentemente trovati in batteri isolati dagli allevamenti (Falgenhauer et al., 2017). Queste osservazioni potrebbero suggerire una correlazione, dal momento che la somministrazione di questi farmaci è comunemente segnalata quando si trovano microrganismi resistenti ai carbapenemi negli animali da produzione alimentare (Bonardi e Pitino, 2019).

La AMR mediata dal cromosoma viene trasmessa verticalmente alle cellule figlie e questi microrganismi possono essere clinicamente rilevanti se producono infezioni gravi che richiedono una terapia antimicrobica. Tuttavia, i geni batterici delle  $\beta$ -lattamasi situati sui plasmidi rappresentano una minaccia per la salute molto maggiore perché possono essere trasmessi orizzontalmente tra batteri e agenti patogeni commensali, diffondendo così la resistenza ai  $\beta$ -lattamici a una grande varietà di specie batteriche. Ad esempio, nel 2001, è stata dimostrata l'evidenza del trasferimento genico orizzontale in isolati animali e

umani di *E. coli* e *Salmonella* destinati alla produzione alimentare resistenti alle cefamicine e alle cefalosporine di terza generazione (Winokur et al., 2001). Da allora, altri studi hanno osservato il trasferimento della resistenza ai carbapenemi, mediata da plasmidi, tra diverse specie batteriche (Goren et al., 2010; Rumbo et al., 2011; Hardiman et al., 2016). Inoltre, è stata dimostrata la prova del trasferimento di trasposoni contenenti il gene CP tra plasmidi, come il gene *bla*<sub>KPC-2</sub> in *K. pneumoniae*. Il gene *bla*<sub>KPC-2</sub> si trova su un trasposone (Nordmann et al., 2009; Cuzon et al., 2011) che è stato descritto anche in un plasmide di *P. aeruginosa*, suggerendo che potrebbe essere trasferito tra diversi microrganismi (Diene e Rolain, 2014) (Bonardi e Pitino, 2019).

Per quanto riguarda il gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, la sua diffusione avviene sia per trasferimento orizzontale che verticale, poiché la sequenza codificante può essere trovata su plasmidi diversi o localizzata sul cromosoma (Poirel et al., 2011).

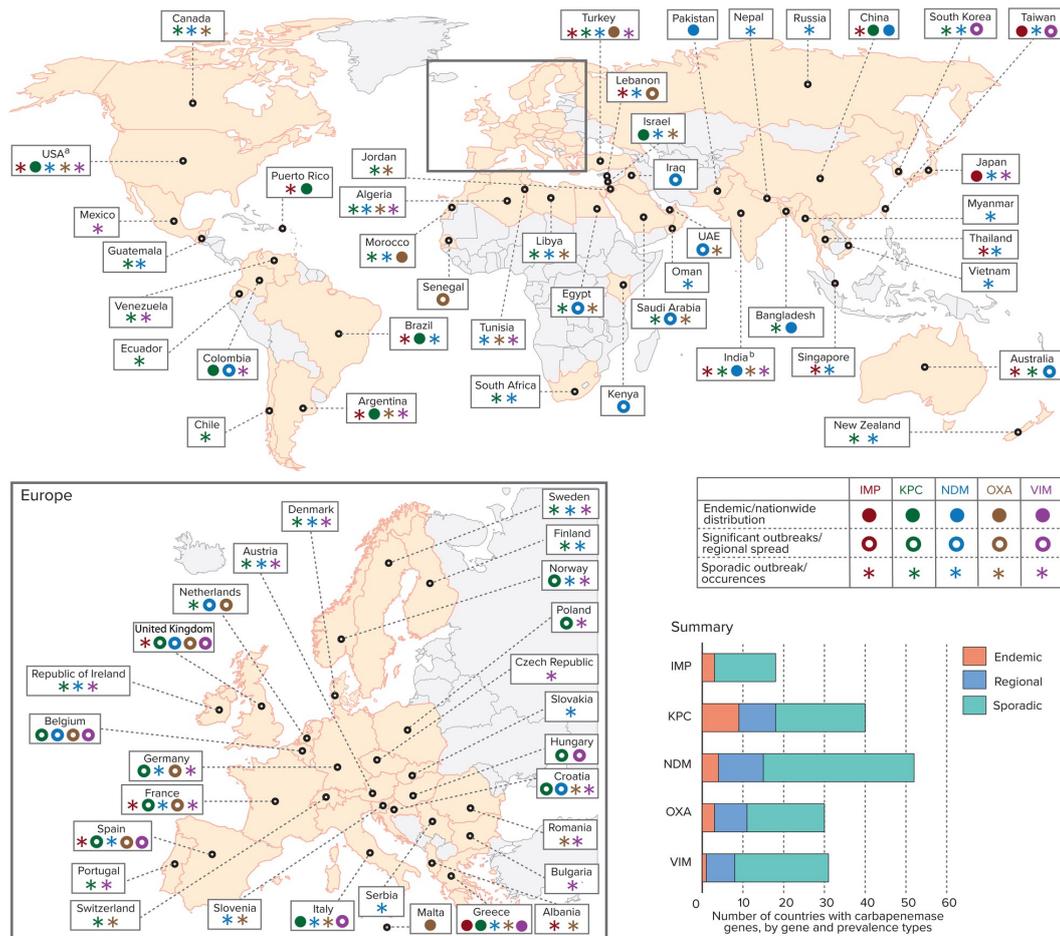
Il gruppo *bla*<sub>VIM-1</sub> è rilevato principalmente nelle Enterobacteriaceae, mentre il gruppo *bla*<sub>VIM-2</sub> si trova principalmente nelle specie *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (Lee et al., 2003; Carattoli, 2009; Pena et al., 2014; Govender et al., 2015).

In allevamenti di suini in Germania, ceppi di *Salmonella Infantis* positivi per VIM-1 sono stati isolati da stivali usati negli allevamenti e ceppi di *E. coli* produttori di VIM-1 da letame e mosche. Infatti, letame e insetti possono agire come vettori di batteri AMR a livello di allevamento, mantenendo e distribuendo i microrganismi AMR per lunghi periodi di tempo. Inoltre, il rilevamento di *S. Infantis* ed *E. coli* che producevano VIM-1 nella stessa fattoria era indicativo del trasferimento genico interspecie a livello di fattoria (Fischer et al., 2017).

Del gene *bla*<sub>IMP</sub> sono state descritte un totale di 55 varianti (Shakibaie et al., 2017) portate da Enterobacteriaceae, specie di *Acinetobacter* non fermentanti e specie del genere *Pseudomonas* (Osano et al., 1994; Chu et al., 2001; Sidjabat et al., 2015). I geni *bla*<sub>IMP</sub> sono trasportati da plasmidi e possono diffondersi orizzontalmente tra specie diverse (Sidjabat et al., 2015) (Bonardi e Pitino, 2019).

La *Figura 6* rappresenta una mappa globale che evidenzia la drammatica diffusione mondiale dei geni delle carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae, per paese e regione.

Ad oggi, la specie più comune di Enterobacteriaceae che ospita geni per carbapenemasi trasmissibili è *K. pneumoniae*.



**Figura 6** Distribuzione globale delle carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae, per paese e regione.

Fonte: Logan et al. (2017).

Attualmente, almeno 52 varianti di geni IMP sono state identificate in più specie con distribuzione mondiale; tuttavia, ad oggi, le Enterobacteriaceae contenenti MBL di tipo IMP sono endemiche solo in Giappone e Taiwan.

Gli MBL di tipo VIM sono stati descritti nel 1996 e nel 1997 in *P. aeruginosa* di Verona, Italia (VIM-1) e Marsiglia, Francia (VIM-2). Oggi, VIM-2 è l'MBL di tipo VIM più comune in tutto il mondo, con almeno 46 varianti *bla*<sub>VIM</sub>. L'epicentro delle Enterobacteriaceae di tipo VIM è la Grecia, dove predominano *K. pneumoniae* ed *E. coli* contenenti *bla*<sub>VIM-1</sub>.

Per quanto riguarda MBL di tipo NDM, c'è stata una diffusione globale con rapido trasferimento genico tra le specie. Nelle regioni di endemicità, come il subcontinente indiano, gli MBL di tipo NDM predominano su altre carbapenemasi. Attualmente ci sono 16 varianti di MBL di tipo NDM, da *bla*<sub>NDM-1</sub> a *bla*<sub>NDM-16</sub>.

La diffusione mondiale delle carbapenemasi di tipo OXA è principalmente attribuita al successo della diffusione dei cloni produttori di OXA-48 e, in misura minore, di OXA-181 in alcune regioni. Diversi paesi hanno segnalato focolai di Enterobacteriaceae produttrici di OXA, ma pochi segnalano endemicità.

L'ascesa globale di Enterobacteriaceae produttrici di KPC rimane una delle pandemie di maggior estensione nella storia dei microrganismi multiresistenti. Ceppi MDR di *K. pneumoniae* sono endemici in un numero crescente di paesi e sono responsabili di molti importanti focolai in tutto il mondo (Logan et al., 2017).

#### **1.4 Scopo della tesi**

La presente Tesi di Laurea si colloca all'interno di un Programma di Sviluppo Rurale (PSR) finanziato dalla Regione Marche. Il progetto dal titolo "Reduction of the use of antibiotics in pig breeding: production and quality effects", previsto per il triennio 2019-2022, ha lo scopo di ridurre l'uso di antibiotici nella filiera suina e al contempo di individuare eventuali serbatoi di carbapeneme-resistenza nella filiera suinicola delle Marche. Le aziende suinicole oggetto dello studio hanno l'obiettivo di ridurre l'uso di farmaci antibiotici nei 120 giorni precedenti la macellazione, fino alla totale eliminazione, con il fine ultimo di ottenere la certificazione SAF ("Suine Antibiotic free"). Il programma consiste in più fasi, a partire dall'applicazione del protocollo antibiotic-free e successive analisi qualitative, panel test e consumer test sulle carni fresche e trasformate, fino ad analisi dell'ambiente di allevamento e degli animali, lungo tutta la loro filiera produttiva, per individuare l'eventuale presenza di microrganismi resistenti ai carbapenemi e geni di resistenza ai carbapenemi. In dettaglio, all'interno di questo ampio progetto, l'area di microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A) si è occupata di analizzare campioni di carne, fegato, reni, prodotti trasformati e feci di suino, provenienti da 5 aziende suinicole delle Marche. Lo scopo dell'analisi è isolare eventuali ceppi di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi. Contemporaneamente viene estratto il DNA microbico totale da ciascun campione, con l'obiettivo di ricercare geni che codificano per le carbapenemasi più diffuse, tramite Real-time PCR (qPCR).

In particolare, nella presente Tesi di Laurea le analisi che sono state eseguite hanno riguardato analisi coltura-dipendenti che prevedevano l'enumerazione di Enterobacteriaceae da alcuni campioni oggetto dello studio, precisamente: 7 campioni di prodotti carne trasformati, 15 campioni di carne, 15 di fegato, 15 di reni e 15 di feci, prelevati da 5 aziende marchigiane partner del progetto. In seguito ad arricchimento selettivo, è stato effettuato un isolamento delle colonie di Enterobacteriaceae cresciute in presenza di ertapenem, antibiotico appartenente alla classe dei carbapenemi. Grazie ad una collaborazione con il gruppo di microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA), gli isolati di Enterobacteriaceae presunti resistenti a ertapenem sono stati sottoposti al Test di

Hodge e al test per la determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC: Minimal Inhibitory Concentration), al fine di confermare o meno la presunta resistenza.

Inoltre, è stato estratto il DNA microbico totale dagli omogenati dei campioni analizzati. Il DNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometro e sarà sottoposto a qPCR per la ricerca dei più comuni geni di resistenza ai carbapenemi.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Campionamento

Nel periodo compreso tra il 18-11-2021 e il 24-05-2022, sono stati effettuati 5 prelievi di campioni provenienti da 5 diversi allevamenti di suini della regione Marche. I campioni sono stati ottenuti in seguito alla macellazione di differenti capi suini. Per ogni animale sono stati prelevati un rene e un fegato allo stato integrale, un campione di carne di circa 100 g e, da alcuni box di allevamento di ogni suino, sono state prelevate le feci. Oltre a questo, nel primo campionamento sono stati analizzati campioni di prodotti carnei trasformati, in particolare salame, soppressata, ciauscolo, lonza, pancetta, lonzino e guanciale. Sono stati così ottenuti 15 campioni di fegato, 15 di reni, 15 di carne, 15 di feci e 7 di carne trasformata per un totale di 67 campioni.

I campioni, elencati in *Tabella 2*, sono stati prelevati con cucchiari o coltelli sterili e posti in sacchetti o contenitori sterili e sono stati conservati refrigerati fino all'arrivo in laboratorio per le analisi.

*Tabella 2 Elenco dei campioni analizzati*

<b>CODICE</b>	<b>CAMPIONE</b>	<b>DATA ANALISI</b>
<b>SAL47</b>	Salame	22/11/2021
<b>SOP47</b>	Soppressata	22/11/2021
<b>CIA47</b>	Ciauscolo	22/11/2021
<b>LON48</b>	Lonza	22/11/2021
<b>PAN48</b>	Pancetta	22/11/2021
<b>LONZI48</b>	Lonzino	22/11/2021
<b>GUA48</b>	Guanciale	22/11/2021
<b>CS49 (1)</b>	Carne	10/03/2022
<b>CS49 (2)</b>	Carne	10/03/2022
<b>CS49 (3)</b>	Carne	10/03/2022
<b>FES49 (1)</b>	Fegato	10/03/2022
<b>FES49 (2)</b>	Fegato	10/03/2022
<b>FES49 (3)</b>	Fegato	10/03/2022
<b>RES49 (1)</b>	Rene	10/03/2022
<b>RES49 (2)</b>	Rene	10/03/2022
<b>RES49 (3)</b>	Rene	10/03/2022
<b>FS49 (1)</b>	Feci	30/03/2022
<b>FS49 (2)</b>	Feci	30/03/2022
<b>FS49 (3)</b>	Feci	30/03/2022
<b>CS50 (1)</b>	Carne	10/03/2022

<b>CS50 (2)</b>	Carne	10/03/2022
<b>FES50 (1)</b>	Fegato	10/03/2022
<b>FES50 (2)</b>	Fegato	10/03/2022
<b>RES50 (1)</b>	Rene	10/03/2022
<b>RES50 (2)</b>	Rene	10/03/2022
<b>FS50 (1)</b>	Feci	30/03/2022
<b>FS50 (2)</b>	Feci	30/03/2022
<b>CS51 (1)</b>	Carne	09/05/2022
<b>CS51 (2)</b>	Carne	09/05/2022
<b>CS51 (3)</b>	Carne	09/05/2022
<b>CS51 (4)</b>	Carne	09/05/2022
<b>CS51 (5)</b>	Carne	09/05/2022
<b>FES51 (1)</b>	Fegato	09/05/2022
<b>FES51 (2)</b>	Fegato	09/05/2022
<b>FES51 (3)</b>	Fegato	09/05/2022
<b>FES51 (4)</b>	Fegato	09/05/2022
<b>FES51 (5)</b>	Fegato	09/05/2022
<b>RES51 (1)</b>	Rene	09/05/2022
<b>RES51 (2)</b>	Rene	09/05/2022
<b>RES51 (3)</b>	Rene	09/05/2022
<b>RES51 (4)</b>	Rene	09/05/2022
<b>RES51 (5)</b>	Rene	09/05/2022
<b>FS51 (1)</b>	Feci	16/05/2022
<b>FS51 (2)</b>	Feci	16/05/2022
<b>FS51 (3)</b>	Feci	16/05/2022
<b>FS51 (4)</b>	Feci	16/05/2022
<b>FS51 (5)</b>	Feci	16/05/2022
<b>CS52 (1)</b>	Carne	23/05/2022
<b>CS52 (2)</b>	Carne	23/05/2022
<b>CS52 (3)</b>	Carne	23/05/2022
<b>CS52 (4)</b>	Carne	23/05/2022
<b>CS52 (5)</b>	Carne	23/05/2022
<b>FES52 (1)</b>	Fegato	23/05/2022
<b>FES52 (2)</b>	Fegato	23/05/2022
<b>FES52 (3)</b>	Fegato	23/05/2022
<b>FES52 (4)</b>	Fegato	23/05/2022
<b>FES52 (5)</b>	Fegato	23/05/2022
<b>RES52 (1)</b>	Rene	23/05/2022
<b>RES52 (2)</b>	Rene	23/05/2022
<b>RES52 (3)</b>	Rene	23/05/2022
<b>RES52 (4)</b>	Rene	23/05/2022
<b>RES52 (5)</b>	Rene	23/05/2022
<b>FS52 (1)</b>	Feci	23/05/2022
<b>FS52 (2)</b>	Feci	23/05/2022
<b>FS52 (3)</b>	Feci	23/05/2022

FS52 (4)	Feci	23/05/2022
FS52 (5)	Feci	23/05/2022

## 2.2 La preparazione dei substrati di crescita

### 2.2.1 Terreno MacConkey Agar

Al fine di isolare i batteri Gram-negativi presenti nei campioni e distinguere, tra questi, i vari gruppi, è stato utilizzato come substrato di crescita agar MacConkey, terreno di coltura solido, selettivo e differenziale. La selettività del terreno è garantita dalla presenza di cristalvioletto e sali biliari: questi permettono la crescita di molti batteri Gram-negativi e in particolare delle Enterobacteriaceae, e inibiscono la crescita della maggior parte di batteri Gram-positivi. Al contempo questo substrato è in grado di differenziare le varie colonie che si sviluppano su di esso grazie al rosso neutro, un indicatore di pH che vira al rosso se il pH scende sotto al 6,8. La presenza di lattosio, come unica fonte di zuccheri, permette di evidenziare quelle colonie che lo fermentano anaerobicamente, producendo così metaboliti acidi che abbassano il pH. I batteri che, al contrario, non sono fermentanti formeranno colonie incolori. La quantità di terreno liofilizzato necessaria, a seconda del volume di terreno finale, è stata diluita in acqua in condizioni di sterilità. La soluzione ottenuta è stata successivamente sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti. La composizione del terreno è indicata in *Tabella 3*.

**Tabella 3** *Composizione del terreno MacConkey Agar*

Peptone	20,0 g/L
Agar agar	15,0 g/L
Lattosio	10,0 g/L
Cloruro di sodio	5,0 g/L
Sali biliari n°3	1,5 g/L
Rosso neutro	0,03 g/L
Cristalvioletto	0,001 g/L
pH 7,1 ± 0,2 a 25°C	

Al contempo si è preparato altro terreno, seguendo la stessa procedura, al quale è stato però aggiunto ertapenem, antibiotico appartenente alla classe dei carbapenemi, ottenendo un substrato di crescita come il precedente, ma selettivo nei confronti dei batteri resistenti alla concentrazione di antibiotico presente nel substrato, pari a 0,12 µg/mL.

La soluzione stock di ertapenem è distribuita in fiale da 50 µL, alla concentrazione di 10 mg/mL. Per ottenere il giusto dosaggio, ovvero la corretta concentrazione di ertapenem e il volume necessario, a seconda della quantità di terreno da utilizzare, si è operato in due step successivi:

- si è eseguita una prima diluizione, prelevando 10 µL di soluzione stock, aggiungendola a 990 µL di acqua distillata, ottenendo 1 mL di soluzione antibiotica con una concentrazione di ertapenem pari a 100 µg/mL;
- si è determinato il volume di soluzione antibiotica diluita da inserire nel terreno a seconda del volume di terreno necessario per la semina, applicando l'*Equazione 1*.

**Equazione 1. Equazione delle diluizioni**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Considerando quindi la concentrazione iniziale di ertapenem ( $C_1$ ) pari a 100 µg/mL e la concentrazione finale ( $C_2$ ) da raggiungere pari a 0,12 µg/mL, a seconda del volume di terreno necessario ( $V_2$ ), si è determinato il volume di soluzione antibiotica da inserire ( $V_1$ ), risolvendo l'equazione in funzione di quest'ultimo, come mostrato in *Equazione 2*.

**Equazione 2. Equazione delle diluizioni isolando il volume iniziale**

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

Il terreno necessario è stato preparato considerando che se ne versano circa 18 mL per ogni piastra. Poi le piastre sono state lasciate riposare capovolte per evitare che le gocce di condensa potessero inquinare il terreno. (*Figura*)

**Figura Piastre Petri con MacConkey Agar e con MacConkey Agar + ertapenem**

**2.2.2 Terreno LB**

Il terreno Luria-Bertani (LB) è un terreno liquido ricco. Questo è stato preparato in laboratorio, seguendo le dosi e gli ingredienti indicati in *Tabella 4*.

**Tabella 4 Composizione del terreno Luria-Bertani**

Triptone	10,0 g/L
Cloruro di sodio	10,0 g/L
Estratto di lievito	5,0 g/L

pH  $7 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$

La soluzione è stata successivamente sterilizzata in autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti. Questa operazione è stata effettuata anche in ulteriori tubi contenenti, oltre ai 10 mL di LB, eritapenem a concentrazione finale di  $0,12 \mu\text{g/mL}$ , seguendo lo stesso metodo descritto per il MacConkey agar.

### 2.2.3 Acqua peptonata

L'acqua peptonata è una soluzione isotonica, utilizzata per ottenere gli omogenati iniziali ed eseguire tutte le successive diluizioni decimali seriali. Sono state preparate un numero di beute pari al numero dei campioni, contenenti 90 mL di acqua peptonata. Inoltre sono stati preparati tubi da 10 mL contenenti 9 mL di acqua peptonata. I tubi e le beute sono stati successivamente sterilizzati in autoclave.

### 2.2.4 Terreno MH Agar

Il terreno Mueller Hinton Agar (MH agar), è stato impiegato per il test di Hodge (*Modified Hodge test*). La sua composizione è indicata in *Tabella 5*.

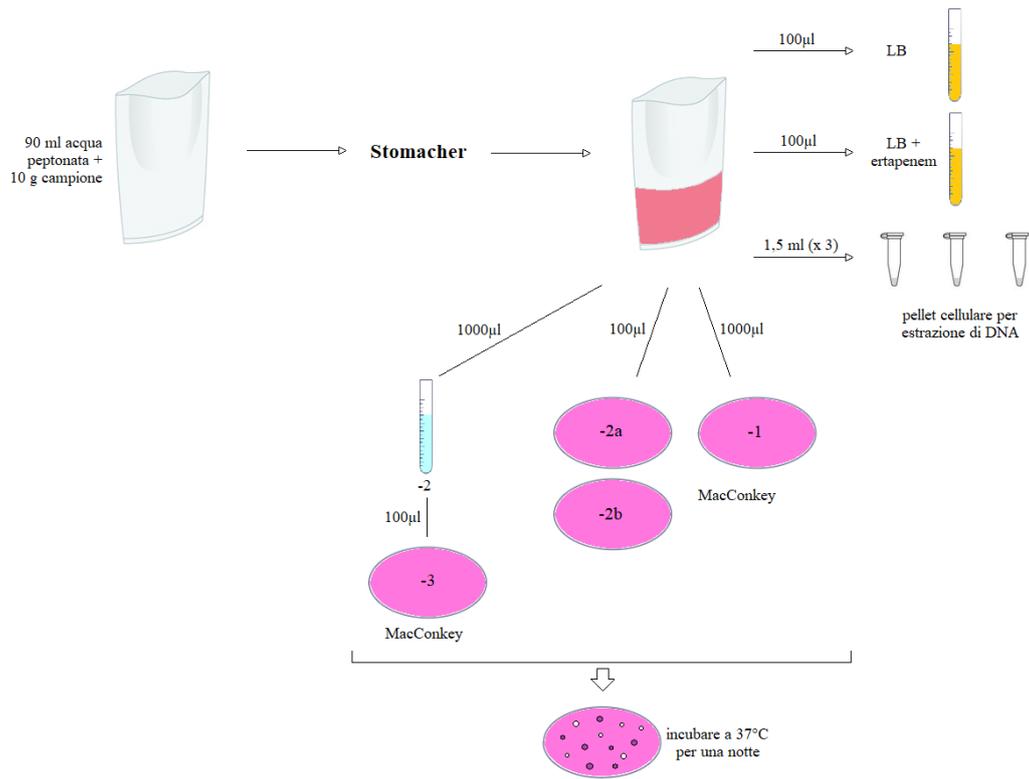
**Tabella 5 Composizione terreno Mueller Hinton Agar**

Idrolizzato acido di caseina	17,5 g/L
Infuso di cuore bovino	2,0 g/L
Amido solubile	1,5 g/L
Agar	17,0 g/L
pH $7,3 \pm 0,2$ a $25^{\circ}\text{C}$	

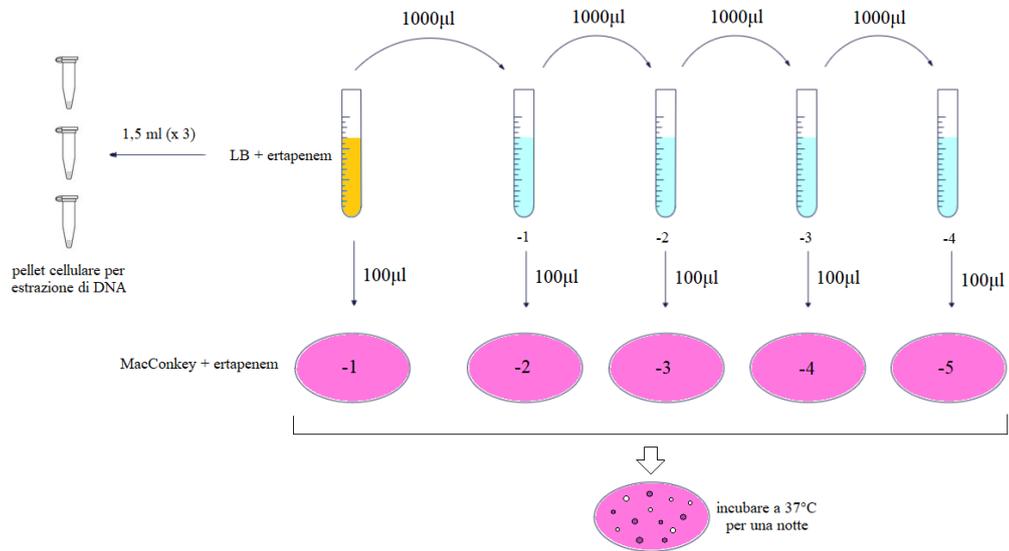
(Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis)

Tutti i terreni sono stati sterilizzati in autoclave azionata a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti.

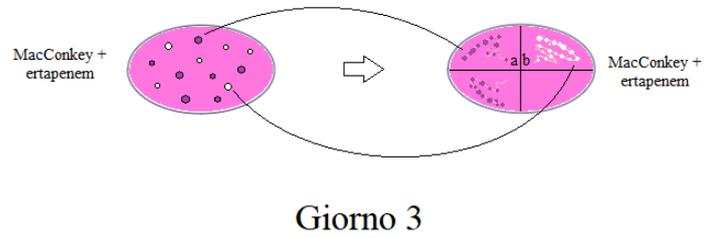
Una volta preparati i vari substrati di crescita, questi sono stati utilizzati per effettuare le varie analisi. In *Figura 7* vengono riportati e riassunti i vari step che sono stati eseguiti sui vari campioni, suddivisi in 3 giorni di analisi.



## Giorno 1



## Giorno 2



*Figura 7 Schema di analisi*

### 2.3 Le conte vitali in piastra

Al fine di enumerare le Enterobacteriaceae presenti nei campioni analizzati, sono state eseguite delle conte vitali in piastra. Inizialmente, per ottenere gli omogenati, sono stati pesati, per ogni campione, in condizioni di sterilità, 10 g ed inseriti, insieme a 90 ml di acqua peptonata sterile, in un sacchetto sterile per Stomacher. Questi sono stati poi posti in Stomacher® 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia), azionando il macchinario a 260 rpm (giri per minuto) per 3 minuti nel caso dei campioni di carne, fegato e reni e 230 rpm per 1 minuto nel caso di feci, poiché meno consistenti. Gli omogenati così ottenuti rappresentavano la prima diluizione dei campioni ( $10^{-1}$ ), perché ottenuti inserendo una parte di campione in 9 parti di acqua peptonata.

Da questi omogenati sono poi state eseguite le successive diluizioni seriali decimali in tubi contenenti 9 mL di acqua peptonata sterile. Nel caso delle feci sono state fatte delle diluizioni fino alla  $10^{-5}$ , mentre per i campioni di carne, fegato e reni è stata realizzata solo una diluizione, passando dalla  $10^{-1}$  (omogenato) alla  $10^{-2}$ . Questo poiché ci si aspettava una concentrazione molto maggiore di microrganismi nel materiale fecale rispetto a quella di carne, fegato e reni, come verificato da prove precedenti effettuate nell'ambito dello stesso progetto di ricerca.

Per eseguire le diluizioni è stato prelevato, per ogni campione, con una micro-pipetta da 1000  $\mu$ L, 1 mL di sospensione cellulare della diluizione precedente e inserito in un tubo contenente 9 mL di acqua peptonata, ottenendo così la diluizione successiva. Si è proceduto quindi, fino ad ottenere il numero di diluizioni seriali decimali necessarie.

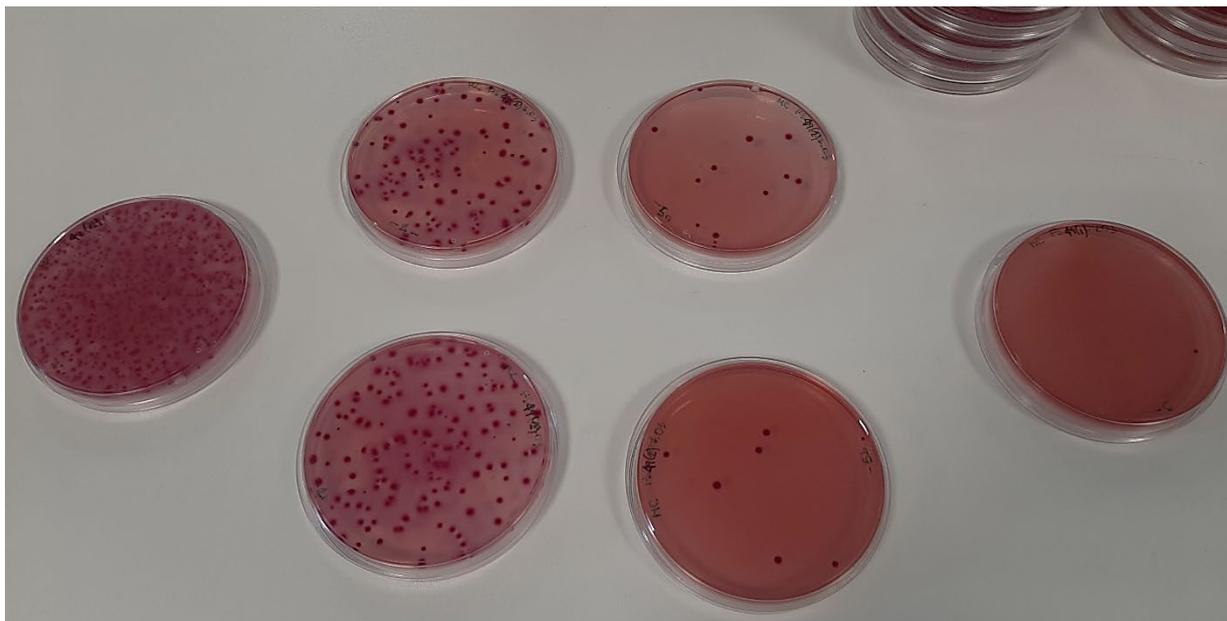
A questo punto è stata eseguita una semina per spatolamento delle varie diluizioni nelle piastre Petri contenenti MacConkey Agar, in doppio.

Le piastre sono state così incubate capovolte a 37°C per 24 ore. Il giorno successivo è stata eseguita la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) per ogni campione, effettuando una conta totale delle Enterobacteriaceae presenti. Per ciascun campione, il conteggio è iniziato dalla piastra in cui le colonie erano contabili, infatti, nelle piastre meno diluite i margini delle colonie formatesi erano confluenti e quindi le colonie indistinguibili (*Figura 8*). Tra le piastre con colonie contabili si considerano poi quelle in cui il numero delle colonie è compreso tra le 30 e le 300: cioè un numero non troppo basso (perché statisticamente non significativo) ma neanche troppo alto (da non essere contabile a causa della confluenza delle colonie).

Per la conta è stata, a questo punto, applicata l'*Equazione 3*, moltiplicando quindi il numero di colonie (UFC) per il fattore di conversione ( $f_c$ ), che è l'inverso del fattore di diluizione.

***Equazione 3. Formula applicata per la determinazione delle UFC/ml***

$$\frac{UFC}{ml} = UFC \times f_c$$



*Figura 8 Colonie cresciute su piastre MacConkey Agar con diverse diluizioni*

#### **2.4 Arricchimento ed isolamento delle Enterobacteriaceae carbapeneme-resistenti**

Parallelamente alle operazioni necessarie per le conte vitali in piastra per l'enumerazione delle Enterobacteriaceae totali, si è proceduto all'isolamento delle CRE. Da ogni omogenato iniziale, ottenuto con 10 g di campione e 90 mL di acqua peptonata, è stata prelevata, con micro-pipette sterili, una quantità di sospensione cellulare dal volume di 100  $\mu$ L, inserita nel tubo contenente LB ed ertapenem e successivamente incubata a 37°C per 24 ore. In questo modo sono stati selezionati solo quei microrganismi in grado di sopravvivere ed accrescersi in presenza dell'antibiotico.

Da queste sospensioni cellulari sono state poi eseguite, per ogni campione, 4 diluizioni decimali seriali ottenendo le diluizioni dalla  $10^{-1}$  fino alla  $10^{-4}$ . Le sospensioni cellulari e le relative diluizioni sono poi state seminate per spatolamento, prelevando ed inoculando 100  $\mu$ L delle stesse su piastre Petri contenenti MacConkey Agar ed ertapenem (0,12  $\mu$ g/mL). In questo modo si sono ottenute piastre con diluizioni dalla  $10^{-1}$  fino alla  $10^{-5}$ . Tutte le operazioni sono state svolte in condizioni di sterilità. A questo punto le piastre sono state lasciate incubare a 37°C per 24 ore.

Il giorno successivo si sono quindi eseguiti gli isolamenti delle Enterobacteriaceae che risultavano resistenti. Nelle piastre incubate, infatti, i batteri resistenti selezionati dall'ertapenem si erano moltiplicati, dando origine a colonie visibili. Per ogni piastra, grazie ad un'indagine visiva, si sono selezionate le colonie morfologicamente differenti che sarebbero state poi isolate. Da ogni campione è stato scelto un isolato da purificare.

Per la purificazione, con l'ausilio di un'ansa da batteriologia, le colonie selezionate sono state prelevate e isolate in coltura pura su piastre Petri sterili con il medesimo terreno di coltura utilizzato per lo sviluppo delle CRE e, prima dello striscio sono state suddivise in quattro quadranti dedicati ciascuno ad un'unica colonia morfologicamente diversa. Le operazioni si sono svolte in condizioni di sterilità, in prossimità della fiamma del becco bunsen. Le piastre contenenti gli strisci sono state poi incubate a 37°C per 24 ore. Il giorno seguente gli strisci risultavano visibili ed erano presenti colonie distinguibili da analizzare mediante Test di Hodge e test della minima concentrazione inibente (MIC).

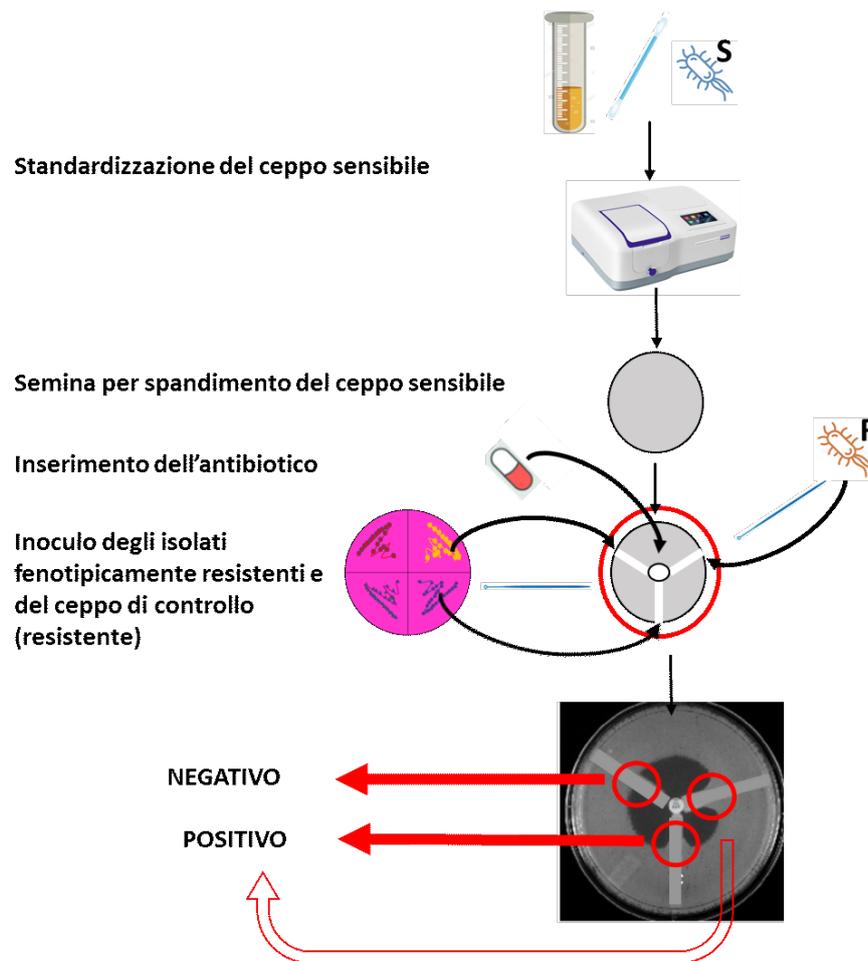
## 2.5 Test di Hodge Modificato

Il Test di Hodge Modificato (MHT) è un test fenotipico che viene utilizzato per valutare la produzione di carbapenemasi da parte dei batteri isolati. In questo studio il MHT è stato effettuato per valutare se la crescita degli isolati in presenza di ertapenem (0,12 µg/mL) fosse dovuta o meno alla produzione di carbapenemasi. Il MHT si basa, infatti, sulla capacità del ceppo testato di annullare l'attività di inibizione del carbapenemico nei confronti di un ceppo di controllo sensibile, *E. coli* ATCC® 25922. La crescita del ceppo di controllo può di fatto essere resa possibile solo nel caso in cui il campione da testare sia in grado di inattivare il carbapenemico mediante la produzione di carbapenemasi. Il MHT viene quindi indicato in letteratura come valido approccio iniziale per valutare la produzione di carbapenemasi negli isolati fenotipicamente resistenti (Nordmann et al., 2012).

Per eseguire il test, come primo step, si è proceduto alla standardizzazione del ceppo sensibile *E. coli* ATCC® 25922. La standardizzazione è stata effettuata prelevando, con un tampone, una colonia del ceppo che è stata poi stemperata in terreno MHII Broth ed in seguito standardizzata alla concentrazione desiderata. Per la determinazione e correzione della concentrazione della sospensione cellulare si è ricorso a misure turbidimetriche, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda di 625 nm. Lo spettrofotometro misura la densità ottica del mezzo analizzato, indicando quindi la torbidità della sospensione cellulare, proporzionale alla massa totale delle cellule presenti nella stessa. Il valore di densità ottica della sospensione cellulare desiderato corrispondeva a 0,1, pari ad una concentrazione di  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Questa concentrazione è stata pertanto raggiunta mediante l'aggiunta alla sospensione batterica di terreno MHII Broth, fino all'ottenimento del giusto valore di densità ottica. La diluizione della sospensione cellulare del ceppo sensibile standardizzato, così ottenuta, è stata quindi seminata su una piastra contenente MH agar, utilizzando un tampone imbevuto in questa sospensione batterica.

A questo punto, al centro di ciascuna piastra seminata si è posto un dischetto contenente 10 µg di ertapenem. Successivamente, sono stati prelevati ed inoculati gli isolati da testare, mediante l'ausilio di un'ansa da batteriologia, su due dei tre raggi della piastra, effettuando uno striscio dal centro verso l'esterno della piastra. Il terzo raggio è stato strisciato con un ceppo produttore di carbapenemasi, utilizzato come controllo

positivo (ad esempio *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705TM). Le piastre così ottenute sono state incubate a 37° per 24 ore e sono poi state valutate: i ceppi produttori di carbapenemasi, come il controllo, vengono distinti dagli altri in quanto nella zona di intersezione tra l'isolato e il ceppo sensibile è possibile osservare un alone di inibizione della crescita deformato, grazie all'azione delle carbapenemasi che, inattivando l'ertapenem, consentono l'accrescimento del ceppo sensibile in tale zona. Il test dà esito negativo se, al contrario, l'alone di inibizione risulta perfettamente circolare.



**Figura 9 Procedura del Test di Hodge Modificato**

## 2.6 Determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)

Il metodo utilizzato per valutare la sensibilità dei ceppi è la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC), ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico necessaria ad inibire la crescita di un microrganismo. Questa metodica è stata eseguita secondo le procedure standard del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

L'antibiotico, in questo caso l'ertapenem, veniva utilizzato per allestire delle diluizioni seriali, in brodo Muller Hinton II (MH II, Sigma-Aldrich) direttamente in piastre microtiter. Il range di concentrazione saggiato andava da 0,006 µg/mL a 8 µg/mL.

L'antibiotico veniva preparato a una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata da saggiare: quindi 50µL di brodo MH II contenente 16 µg/mL di ertapenem venivano inoculati nella prima e nella seconda colonna della piastra. Partendo dalla seconda colonna, per allestire delle diluizioni scalari (1:2) dell'antibiotico, si prelevavano con una pipetta multicanale 50 µL e si inoculavano nella colonna successiva; si procedeva in questo modo fino alla penultima colonna. In ogni riga veniva inoculato un ceppo diverso (compreso il ceppo di controllo *E. coli* ATCC® 25922), le cui brodoculture erano state precedentemente standardizzate in modo da contenere  $1 \times 10^8$  Unità Formanti Colonia (UFC)/mL. La sospensione veniva ulteriormente diluita 1:100 ottenendo una concentrazione finale pari a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. La piastra veniva infine incubata in termostato a 37°C overnight. Il giorno successivo si procedeva con la lettura dei risultati, facendo riferimento ai valori riportati nelle tabelle fornite dal CLSI e dopo aver verificato che il ceppo di controllo ATCC 25922 rientrasse nei limiti previsti.

Per l'ertapenem, il breakpoint di resistenza per le Enterobacteriaceae, è di 1 µg/mL, pertanto tutti i ceppi che mostravano un valore di MIC >2 erano resistenti.

## **2.6 L'estrazione del DNA microbico totale**

Per ogni campione, a partire dagli omogenati iniziali, ottenuti inserendo 10 g di campione in 90 mL di acqua peptonata, sono state prelevate con micro-pipette sterili delle sospensioni cellulari di 1,5 mL in triplice copia. Ogni sospensione è stata inserita, in condizioni di sterilità, in una provetta Eppendorf e posta in centrifuga.

La centrifuga è stata azionata alla massima velocità per 5 minuti al fine di separare le due frazioni: il pellet e il surnatante. Quest'ultimo è stato poi eliminato e i pellet conservati a -20°C. I pellet ottenuti dagli omogenati sono stati utilizzati per l'estrazione e quantificazione del DNA microbico.

Per l'estrazione del DNA si è proceduto utilizzando uno specifico kit: "E.Z.N.A.® Soil DNA Kit" (Omega Bio-tek) e applicando i vari step indicati dallo stesso, che possono raggrupparsi in sei fasi:

- *lisi*: consiste nella rottura delle membrane cellulari per favorire la fuoriuscita degli acidi nucleici;
- *rimozione degli inibitori*: per inattivare eventuali nucleasi cellulari o altri enzimi che possono ostacolare le successive operazioni;
- *formazione dei legami*: il DNA, grazie all'utilizzo di particolari soluzioni, viene indotto a formare dei legami con una membrana in silice presente in una colonnina fornita dal Kit;

- *lavaggio*: consiste nell'allontanamento di eventuali contaminanti dalla membrana, per trattenere solo il DNA;
- *eluizione*: il DNA purificato presente nella membrana viene indotto, grazie all'utilizzo di specifiche soluzioni, a rompere i legami con la membrana, per essere raccolto in purezza in una nuova provetta Eppendorf ottenendo un volume di 100  $\mu\text{L}$  acqua con il DNA eluito.

Poiché da precedenti analisi effettuate nello stesso ambito di ricerca l'estrazione del DNA dai campioni di carne è risultata difficoltosa e si ottenevano basse rese di DNA non sufficientemente puri per le analisi molecolari successive, sono stati modificati gli ultimi step dell'estrazione relativi alla fase di eluizione. Precisamente, dopo l'inserimento del buffer di eluizione, i campioni sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per 15 minuti, anziché 1-2 minuti e, in seguito alla centrifugazione e al recupero dei filtrati, sono stati lasciati riposare per altri 15 minuti a temperatura ambiente, anziché 2 minuti come indicato dal Kit.

Il DNA così estratto è stato quantificato e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per la successiva ricerca di geni codificanti per le carbapenemasi attraverso qPCR.

## **2.8 La quantificazione del DNA microbico mediante spettrofotometro**

La quantificazione del DNA estratto dai vari campioni è stata eseguita mediante spettrofotometro *Spectrophotometer UV-1800* (Shimadzu Corporation, Giappone).

Il macchinario è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 260 nm, radiazione assorbita dalle basi azotate del DNA, in virtù della loro natura chimica. Si è proceduto quindi alla sua taratura inserendo in una cuvetta in quarzo 500  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata sterile, con valore di assorbanza (ABS) pari a zero, utilizzata dal macchinario come confronto.

Successivamente, in un'altra cuvetta, sono stati inseriti, per ciascun campione, 5  $\mu\text{L}$  di DNA e 495  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata sterile, effettuando così una diluizione 1:100. A questo punto si è eseguita la lettura con lo spettrofotometro.

Lo spettrofotometro indica l'ABS, ovvero il valore di radiazione che il campione è in grado di assorbire. Questa è in relazione alla concentrazione di DNA nel campione. Sapendo che un campione con una concentrazione di DNA di 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  attraversato da una lunghezza d'onda di 260 nm fornisce un valore pari ad 1 ABS e che i campioni sono stati diluiti 1:100 è possibile, mediante una proporzione, ricavare l'*Equazione 4* e stimare dunque la concentrazione di DNA dei campioni.

***Equazione 4 Concentrazione di DNA in funzione dell'assorbanza***

$$DNA \left( \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 50 \left( \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) \times 100$$

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Enumerazione di Enterobacteriaceae

In *Tabella 6* sono riportati i risultati di tutte le analisi effettuate sui campioni e sugli isolati. Poiché è stata isolata 1 colonia per ogni campione, per praticità l'isolato batterico ha lo stesso codice del campione di partenza. Pertanto in *Tabella 6* sono riportati i risultati della Enumerazione delle Enterobacteriaceae del campione specificato con codice e data di campionamento e il valore di MIC e i risultati del Test di Hodge Modificato riferiti alla colonia fenotipicamente resistente ad ertapenem, isolata dal campione corrispondente.

*Tabella 6 Risultati delle analisi microbiologiche e test quali-quantitativi sugli isolati per verificare la resistenza ad ertapenem*

Codice	Campione	Data campionamento	Enterobacteriaceae (log CFU/g ± dev std)	MIC	Test di Hodge
Salame	<b>SAL47</b>	22/11/2021	< 1	<0,25	-
Soppressata	<b>SOP47</b>	22/11/2021	< 1	<0,25	-
Ciauscolo	<b>CIA47</b>	22/11/2021	< 1	<0,25	-
Lonza	<b>LON48</b>	22/11/2021	< 1	0,5	-
Pancetta	<b>PAN48</b>	22/11/2021	< 1	0,5	-
Lonzino	<b>LONZI48</b>	22/11/2021	< 1	1	-
<b>Guanciale</b>	<b>GUA48</b>	<b>22/11/2021</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>2</b>	<b>-</b>
Carne	<b>CS49 (1)</b>	10/03/2022	2,35 ± 0,17	<0,25	-
Carne	<b>CS49 (2)</b>	10/03/2022	2,71 ± 0,01	<0,25	-
Carne	<b>CS49 (3)</b>	10/03/2022	2,15 ± 0,21	0,25	-
Fegato	<b>FES49 (1)</b>	10/03/2022	2,09 ± 0,12	1	-
Fegato	<b>FES49 (2)</b>	10/03/2022	1,35 ± 0,49	0,5	-
Fegato	<b>FES49 (3)</b>	10/03/2022	0,85 ± 1,20	0,5	-
Rene	<b>RES49 (1)</b>	10/03/2022	0,65 ± 0,92	<0,25	-
Rene	<b>RES49 (2)</b>	10/03/2022	< 1	0,25	-
Rene	<b>RES49 (3)</b>	10/03/2022	0,65 ± 0,92	1	-
Feci	<b>FS49 (1)</b>	30/03/2022	6,22 ± 0,05	<0,25	-
Feci	<b>FS49 (2)</b>	30/03/2022	7,00 ± 0,05	<0,25	-
Feci	<b>FS49 (3)</b>	30/03/2022	6,21 ± 0,04	<0,25	-
<b>Carne</b>	<b>CS50 (1)</b>	<b>10/03/2022</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>2</b>	<b>-</b>
Carne	<b>CS50 (2)</b>	10/03/2022	1,85 ± 0,21	1	-
Fegato	<b>FES50 (1)</b>	10/03/2022	2,13 ± 0,49	<0,25	-
Fegato	<b>FES50 (2)</b>	10/03/2022	2,17 ± 0,18	0,25	-
Rene	<b>RES50 (1)</b>	10/03/2022	0,5 ± 0,71	0,5	-

Rene	RES50 (2)	10/03/2022	0,5 ± 0,71	<0,25	-
Feci	FS50 (1)	30/03/2022	5,69 ± 0,00	<0,25	-
Feci	FS50 (2)	30/03/2022	6,21 ± 0,02	<0,25	-
Carne	CS51 (1)	09/05/2022	3,25 ± 0,07	1	-
Carne	CS51 (2)	09/05/2022	3,52 ± 0,03	<0,25	-
Carne	CS51 (3)	09/05/2022	3,06 ± 0,03	0,25	-
Carne	CS51 (4)	09/05/2022	2,59 ± 0,16	<0,25	-
Carne	CS51 (5)	09/05/2022	2,63 ± 0,04	<0,25	-
Fegato	FES51 (1)	09/05/2022	3,09 ± 0,07	<0,25	-
Fegato	FES51 (2)	09/05/2022	2,70 ± 0,00	2	-
Fegato	FES51 (3)	09/05/2022	2,40 ± 0,13	0,5	-
Fegato	FES51 (4)	09/05/2022	3,74 ± 0,18	1	-
Fegato	FES51 (5)	09/05/2022	2,89 ± 0,09	<0,25	-
Rene	RES51 (1)	09/05/2022	3,75 ± 0,03	0,25	-
Rene	RES51 (2)	09/05/2022	2,88 ± 0,17	0,5	-
Rene	RES51 (3)	09/05/2022	2,67 ± 0,16	<0,25	-
Rene	RES51 (4)	09/05/2022	2,14 ± 0,20	1	-
Rene	RES51 (5)	09/05/2022	2,74 ± 0,23	2	-
Feci	FS51 (1)	16/05/2022	6,43 ± 0,33	<0,25	-
Feci	FS51 (2)	16/05/2022	7,16 ± 0,02	<0,25	-
Feci	FS51 (3)	16/05/2022	6,25 ± 0,04	<0,25	-
Feci	FS51 (4)	16/05/2022	6,19 ± 0,05	0,25	-
Feci	FS51 (5)	16/05/2022	6,19 ± 0,05	0,5	-
Carne	CS52 (1)	23/05/2022	0,95 ± 1,35	<0,25	-
Carne	CS52 (2)	23/05/2022	1,00 ± 1,41	<0,25	-
Carne	CS52 (3)	23/05/2022	2,40 ± 0,11	1	-
Carne	CS52 (4)	23/05/2022	2,70 ± 0,29	0,5	-
Carne	CS52 (5)	23/05/2022	< 1	<0,25	-
Fegato	FES52 (1)	23/05/2022	3,00 ± 0,06	0,25	-
Fegato	FES52 (2)	23/05/2022	3,70 ± 0,11	0,5	-
Fegato	FES52 (3)	23/05/2022	3,52 ± 0,12	<0,25	-
Fegato	FES52 (4)	23/05/2022	2,67 ± 0,04	1	-
Fegato	FES52 (5)	23/05/2022	4,45 ± 0,06	2	-
Rene	RES52 (1)	23/05/2022	< 1	<0,25	-
Rene	RES52 (2)	23/05/2022	1,00 ± 1,41	<0,25	-
Rene	RES52 (3)	23/05/2022	1,98 ± 0,03	<0,25	-
Rene	RES52 (4)	23/05/2022	< 1	0,25	-
Rene	RES52 (5)	23/05/2022	< 1	1	-
Feci	FS52 (1)	23/05/2022	7,73 ± 0,21	2	-
Feci	FS52 (2)	23/05/2022	7,70 ± 0,22	<0,25	-
Feci	FS52 (3)	23/05/2022	7,64 ± 0,23	<0,25	-
Feci	FS52 (4)	23/05/2022	7,66 ± 0,19	0,25	-
Feci	FS52 (5)	23/05/2022	7,43 ± 0,18	<0,25	-

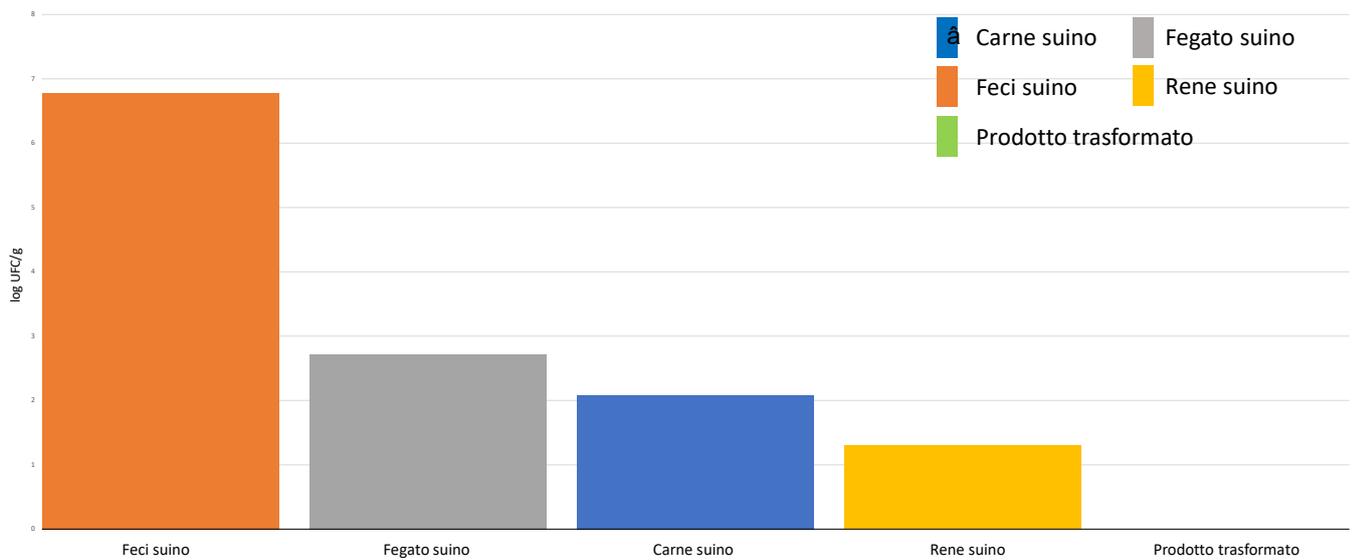
Per quanto riguarda l'enumerazione delle Enterobacteriaceae, i risultati, espressi in logaritmo decimale delle Unità Formanti Colonia per grammo di campione (log UFC/g), sono stati ottenuti eseguendo la media dei valori ottenuti dalle piastre contabili e ne viene indicata la deviazione standard dalla media.

Le semine sono state eseguite su terreno MacConkey, senza l'aggiunta di antibiotico, con lo scopo di valutare la carica complessiva di Enterobacteriaceae nei campioni in esame. I risultati mostravano una certa variabilità, con valori massimi di poco inferiori a 8 log UFC/g e campioni in cui non si osservavano colonie.

I dati in *Tabella 6* sono stati graficati in *Figura 8*, che mostra la distribuzione decrescente delle medie delle conte vitali, espresse in log UFC/g. È possibile notare, come atteso, che nelle feci la carica di Enterobacteriaceae è elevata, con valori compresi tra 5 log UFC/g e 8 log UFC/g. Nei campioni di carne, fegato e reni si riscontravano valori medi più bassi rispetto alle feci, con piastre in cui i valori massimi registrati erano di 5 log UFC/g. In particolare, i valori medi osservati andavano da 0,95 a 3,52 log UFC/g per la carne, da 0,85 a 4,45 log UFC/g per il fegato e da valori inferiori ad 1 di Enterobacteriaceae a 3,75 log UFC/g per i reni. Infine, in tutti i campioni di carne trasformata non sono state riscontrate colonie di Enterobacteriaceae.

In *Figura 9*, invece, si osservano le medie dei valori medi delle conte vitali dei campioni suddivisi per tipologia (carne, prodotto trasformato, fegato, reni, feci). In questo caso il grafico mostra in maniera evidente come le feci rappresentino il substrato con la carica di Enterobacteriaceae più elevata con una media di 6,78 log UFC/g, rispetto alla media dei valori delle conte vitali dei campioni di fegato (pari a 2,72 log UFC/g), carne (pari a 2,08 log UFC/g) e reni (pari a 1,30 log UFC/g) che risultano notevolmente inferiori.





**Figura 11** Distribuzione delle medie dei valori medi delle conte vitali espressi in log UFC/g divisi per tipologia di campione. In blu i campioni di carne, in grigio di fegato, in arancione di feci, in giallo di reni e in verde di prodotto trasformato.

La presenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nella carne di animali da macello rappresenta un'importante fonte di preoccupazione, in quanto è proprio la carne a rappresentare uno dei principali vettori tramite i quali questi microrganismi, e di conseguenza i geni di resistenza a loro associati, possono raggiungere l'uomo con la dieta. Considerando che i carbapenemi non vengono somministrati in ambito animale, si ipotizza che l'eventuale presenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi provenienti da allevamenti derivi da contaminazioni ambientali.

Le Enterobacteriaceae sono microrganismi ubiquitari che risiedono abitualmente nell'intestino dell'uomo e della maggior parte degli animali. Alcune specie sono patogene, mentre altre fanno parte della normale flora commensale e possono causare infezioni opportunistiche. La pressione selettiva esercitata dall'ampio e indiscriminato uso di antibiotici ha favorito la diffusione di ceppi caratterizzati da un fenotipo di multi resistenza (Antonelli et al., 2008).

Questi microrganismi, quindi, non dovrebbero essere presenti nella carne degli animali, a meno che non avvenga una contaminazione in fase di macellazione a causa del contatto, diretto o indiretto, della carne con del materiale fecale (Di Ciccio., 2016).

Nel presente lavoro di Tesi, i valori ottenuti dalle conte vitali dei campioni di carne suina sono in linea con i valori precedentemente osservati in alcuni mattatoi della Germania e del nord Italia (Schill et al., 2017; Di Ciccio et al., 2016). Lo stesso si può dire dei campioni di fegato e reni, che hanno mostrato valori simili

a quelli ottenuti dalle conte dei campioni carnei ed in linea con quelli riscontrati negli studi precedenti (De Angelis, 2019; Giampieri, 2021).

Al contrario, come atteso, la carica di Enterobacteriaceae rilevata nei campioni di feci è considerevolmente più elevata, essendo materiale derivante direttamente dal tratto intestinale degli animali.

### 3.2 Isolamento e test qualitativi (Test di Hodge Modificato) e quantitativi (MIC) sugli isolati

Come si può osservare in *Tabella 6* il Test di Hodge Modificato ha mostrato esito negativo per tutti gli isolati evidenziando l'assenza di produzione di carbapenamasi attive da parte dei ceppi testati (-).

Dai risultati emerge che la maggior parte degli isolati ha valori di MIC compresi tra  $<0,25$  (-) e  $1 \mu\text{g/mL}$ , ad indicare che sono sensibili all'ertapenem ( $< 1 \mu\text{g/mL}$ ) o hanno una sensibilità intermedia (pari a  $1 \mu\text{g/mL}$ ), 6 isolati (da fegato, reni, carne, feci e guancia) hanno valori di MIC pari a 2 ( $>2 \mu\text{g/mL}$  = resistenza) (evidenziati in giallo in *Tabella 6*), ad indicare una possibile resistenza all'ertapenem, seppur di basso livello. Tale resistenza potrebbe essere causata da meccanismi diversi da quello di produzione di carbapenamasi, come un'alterazione della permeabilità di membrana o la produzione di  $\beta$ -lattamasi. I 6 ceppi verranno, successivamente identificati in modo da escludere la loro appartenenza a specie batteriche intrinsecamente resistenti all'ertapenem.

Tali dati sono in linea con gli studi precedenti svolti in allevamenti di suini e bovini (De Angelis, 2019; Giampieri, 2021) e con studi internazionali che rilevano basse incidenze di resistenze ai carbapenemi in allevamenti suini in Italia (Pulss et al., 2017) e nel mondo (Köck et al., 2018). Tuttavia, solo dalle analisi del DNA microbico totale estratto da ciascun campione, si potrà avere un quadro completo circa la presenza eventuale di geni di resistenza ai carbapenemi.

### 3.3 Resa del DNA microbico totale estratto

In *Tabella 7* sono riportati i risultati della determinazione della assorbanza e della concentrazione del DNA microbico totale estratto dai vari campioni.

*Tabella 7 Risultati della quantificazione del DNA mediante spettrofotometro.*

CODICE	CAMPIONE	ABS <sub>260</sub>	DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
SAL47	Salame	0,005	25
SOP47	Soppresato	0,004	20
CIA47	Ciauscolo	0,005	25
LON48	Lonza	0,002	10
PAN48	Pancetta	0,001	5
LONZI48	Lonzino	0,003	15
GUA48	Guancia	0,002	10
CS49 (1)	Carne	0,001	5
CS49 (2)	Carne	0,003	15

<b>CS49 (3)</b>	Carne	0,002	10
<b>FES49 (1)</b>	Fegato	0,005	25
<b>FES49 (2)</b>	Fegato	0,001	5
<b>FES49 (3)</b>	Fegato	0,009	45
<b>RES49 (1)</b>	Rene	0,021	105
<b>RES49 (2)</b>	Rene	0,009	45
<b>RES49 (3)</b>	Rene	0,017	85
<b>FS49 (1)</b>	Feci	0,007	35
<b>FS49 (2)</b>	Feci	0,007	35
<b>FS49 (3)</b>	Feci	0,005	25
<b>CS50 (1)</b>	Carne	0,004	20
<b>CS50 (2)</b>	Carne	0,002	10
<b>FES50 (1)</b>	Fegato	0,013	65
<b>FES50 (2)</b>	Fegato	0,002	10
<b>RES50 (1)</b>	Rene	0,003	15
<b>RES50 (2)</b>	Rene	0,005	25
<b>FS50 (1)</b>	Feci	0,008	40
<b>FS50 (2)</b>	Feci	0,008	40
<b>CS51 (1)</b>	Carne	0,003	15
<b>CS51 (2)</b>	Carne	0,003	15
<b>CS51 (3)</b>	Carne	0,004	20
<b>CS51 (4)</b>	Carne	0,001	5
<b>CS51 (5)</b>	Carne	0,003	15
<b>FES51 (1)</b>	Fegato	0,013	65
<b>FES51 (2)</b>	Fegato	0,005	25
<b>FES51 (3)</b>	Fegato	0,006	30
<b>FES51 (4)</b>	Fegato	0,008	40
<b>FES51 (5)</b>	Fegato	0,004	20
<b>RES51 (1)</b>	Rene	0,006	30
<b>RES51 (2)</b>	Rene	0,014	70
<b>RES51 (3)</b>	Rene	0,017	85
<b>RES51 (4)</b>	Rene	0,011	55
<b>RES51 (5)</b>	Rene	0,009	45
<b>FS51 (1)</b>	Feci	0,003	15
<b>FS51 (2)</b>	Feci	0,005	25
<b>FS51 (3)</b>	Feci	0,004	20
<b>FS51 (4)</b>	Feci	0,002	10
<b>FS51 (5)</b>	Feci	0,008	40
<b>CS52 (1)</b>	Carne	0,005	25
<b>CS52 (2)</b>	Carne	0,006	30
<b>CS52 (3)</b>	Carne	0,001	5
<b>CS52 (4)</b>	Carne	0,002	10
<b>CS52 (5)</b>	Carne	0,001	5
<b>FES52 (1)</b>	Fegato	0,004	20
<b>FES52 (2)</b>	Fegato	0,006	30

<b>FES52 (3)</b>	Fegato	0,004	20
<b>FES52 (4)</b>	Fegato	0,004	20
<b>FES52 (5)</b>	Fegato	0,008	40
<b>RES52 (1)</b>	Rene	0,013	65
<b>RES52 (2)</b>	Rene	0,011	55
<b>RES52 (3)</b>	Rene	0,01	50
<b>RES52 (4)</b>	Rene	0,015	75
<b>RES52 (5)</b>	Rene	0,009	45
<b>FS52 (1)</b>	Feci	0,008	40
<b>FS52 (2)</b>	Feci	0,013	65
<b>FS52 (3)</b>	Feci	0,007	35
<b>FS52 (4)</b>	Feci	0,013	65
<b>FS52 (5)</b>	Feci	0,006	30

I dati ottenuti mostrano una certa variabilità, con una concentrazione minima di 5 µg/µL e una concentrazione massima di 105 µg/µL nel campione RES49 (1) di rene.

In particolare, i campioni di carne presentavano una concentrazione di DNA compresa tra 5 e 30 µg/µL, i campioni di fegato presentavano valori compresi tra 5 e 65 µg/µL, quelli di reni tra 15 e 105 µg/µL, quelli di feci tra 10 e 65 µg/µL e infine quelli di carne trasformata oscillavano tra 5 e 25 µg/µL.

I DNA microbici estratti e quantificati saranno necessari per effettuare successive analisi molecolari (qPCR) e stabilire l'eventuale presenza di geni codificanti per la produzione di carbapenemasi.

## 4. CONCLUSIONI

La presenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nei prodotti della filiera agro-alimentare e zootecnica, costituisce una rilevante fonte di preoccupazione in quanto rappresenta un potenziale serbatoio di diffusione di antibiotico-resistenze trasmissibili.

La presente Tesi di Laurea ha avuto lo scopo di individuare l'eventuale presenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi e di estrarre il DNA dai campioni in esame per la ricerca futura di geni di resistenza ai carbapenemi nella filiera suinicola delle Marche, in continuità al lavoro svolto nelle precedenti Tesi di Laurea (De Angelis, 2019; Giampieri, 2021). I dati raccolti nel presente lavoro sono rassicuranti e sono in linea con gli studi precedenti, dal momento che tra i 67 campioni analizzati e prelevati dalle aziende della Regione Marche, ottenuti da campioni di carne, prodotti trasformati, fegato, reni e feci, non sono state individuate resistenze trasmissibili ai carbapenemi. Tuttavia, sono necessari studi successivi sugli isolati con breakpoint di MIC pari a 2 per confermare o meno la suscettibilità di questi campioni all'ertapenem. Inoltre, studi futuri sugli estratti di DNA microbico totale, potrebbero rivelare la presenza di geni codificanti carbapenemasi. Solo dal duplice approccio coltura-dipendente e -indipendente, si potrà avere un quadro più completo riguardo la presenza di resistenze trasmissibili nei campioni oggetto dell'analisi.

E' importante continuare a monitorare il fenomeno della resistenza ai carbapenemi nei vari serbatoi ambientali, in quanto esso è in continua evoluzione e rappresenta una grave minaccia alla salute pubblica mondiale.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli G., Clementi M., Pozzi G., Rossolini G.M., 2008. *Principi di microbiologia medica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
2. Armin S., Fallah F., Karimi A., Azimi T., Kafil H. S., Zahedani S. S., Ghanaiee R. M., Azimi L., 2021. Multicentre study of the main carbapenem resistance mechanisms in important members of the Enterobacteriaceae family in Iran. *New Microbes and New Infections*, 41, 100860.
3. Blair J. M., Richmond G. E., Piddock L. J., 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, 9(10), 1165-1177.
4. Blair J., Webber M., Baylay A. et al., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51.
5. Bonardi S., & Pitino R., 2019. Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian journal of food safety*, 8(2).
6. Brunton L.L., Hilal-Dandan R., Knollmann B.C., 2019. *Le basi farmacologiche della terapia*. Bologna, Zanichelli editore.
7. De Angelis C., 2019. Studio della diffusione di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nella filiera bovina e suina della regione Marche.
8. Di Ciccio P., Ossiprandi M. C., Zanardi E., Ghidini S., Belluzzi G., Vergara A., Ianieri A., 2016. Microbiological contamination in three large-scale pig slaughterhouses in Northern Italy. *Italian journal of food safety*, 5(4).
9. Giampieri A., 2021. Indagine sulla incidenza di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nella filiera suinicola della regione Marche.
10. Kelly, A. M., Mathema, B., & Larson, E. L., 2017. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International journal of antimicrobial agents*, 50 (2), 127-134.
11. Lancini G., Parenti F., Gallo G.G., 1995. *Antibiotics: a multidisciplinary approach*. New York, Springer.
12. Logan L. K., & Weinstein R. A., 2017. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl\_1), S28-S36.

13. Macareño-Castro J., Solano-Salazar A., Mohiuddin M., Espinoza J. L., 2022. Fecal microbiota transplantation for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *Journal of Infection*.
14. Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A., 2016. *BROCK Biologia dei microrganismi*. Milano, Pearson Italia.
15. Mills M. C., & Lee J., 2019. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, 255, 113143.
16. Mohammed I. El-Gamal, Imen Brahim, Noorhan Hisham, Rand Aladdin, Haneen Mohammed, Amany Bahaaeldin, 2017. Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 131, Pages 185-195, ISSN 0223-5234.
17. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A., 2010. *Microbiologia medica*. Elsevier.
18. Nordmann P., Cornaglia G., 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 18, 432-438.
19. Pratt W.B., Taylor P., 1998. *Farmacologia. Meccanismi di azione dei farmaci*. Bologna, Zanichelli editore.
20. Pulss S., Semmler T., Prenger-Berninghoff E., Bauerfeind R., Ewers C., 2017. First report of an Escherichia coli strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *International journal of antimicrobial agents*, 50(2), 232-236.
21. Roschanski N., Friese A., von Salviati-Claudius C., Hering J., Kaesbohrer A., Kreienbrock L., Roesler U., 2017. Prevalence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolated from German pig-fattening farms during the years 2011–2013. *Veterinary microbiology*, 200, 124-129.
22. Schill F., Abdulmawjood A., Klein G., Reich, F., 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *International journal of food microbiology*, 257, 58-66.
23. Schrijver R., Stijntjes M., Rodríguez-Baño J., Tacconelli E., Rajendran N. B., Voss A., 2018. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical microbiology and infection*, 24(6), 577-590.
24. Sleiman A., Fayad A. G. A., Banna H., Matar G. M., 2021. Prevalence and molecular epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli and their resistance determinants in the Eastern Mediterranean Region over the last decade. *J Glob Antimicrob Resist*, 25, 209-221.

25. Temkin E., Adler A., Lerner A., Carmeli Y., 2014. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and management. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1), 22-42.
26. Tilahun M., Kassa Y., Gedefie A., Ashagire M., 2021. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. *Infect Drug Resist*, 14, 4363-4374.
27. Wright G. D., 2011. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications*, 47(14), 4055-4061.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto la Professoressa Cristiana Garofalo per la disponibilità, per la pazienza nell'ultimo periodo di stesura della tesi e per avermi permesso di fare questa esperienza che oltre ad essere stata arricchente, ha fatto sì che mi appassionassi alla microbiologia. Ringrazio inoltre le mie correlatrici, la Dottoressa Serena Simoni e la Dottoressa Vesna Milanovic.

Non posso non ringraziare la Dottoressa Cristiana Cesaro che mi ha accompagnata e seguita ogni giorno durante la parte sperimentale, con massima competenza e attenzione.

Vorrei poi ringraziare la mia famiglia, mamma e papà, per appoggiarmi sempre in tutte le mie scelte.

Un grazie speciale alla mia psicologa, per il supporto che mi ha dato durante questi ultimi due anni, ma soprattutto per avermi accompagnata durante il percorso di crescita che ho vissuto nell'ultimo periodo della mia vita.

Ringrazio gli amici conosciuti in questi anni di università, con cui ho condiviso soddisfazioni, stress vari e giochi da tavolo.

Grazie a Giordano che mi rende felice e mi sostiene ogni giorno e che è stato un aiuto fondamentale anche durante la scrittura della Tesi.

Infine, grazie agli amici di una vita, grazie a Richi e grazie alle mie persone preferite, Harà e Sara.