

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia

**Caratterizzazione fenotipica e genomica
dei ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno
non fermentanti il lattosio**

Relatore	Specializzanda
Prof.ssa Anna Marchese	Giovanna Croce

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

Abstract

1. Introduzione

1.1 Definizione e classificazione delle infezioni urinarie

1.1.1 Classificazione anatomica

1.1.2 Classificazione in base alla complessità

1.1.3 Classificazione in base alla frequenza

1.1.4 Classificazione in base alla sintomatologia

1.1.5 Classificazione in base al contesto clinico

2. Patogenesi e risposta immunitaria

3. Eziologia ed Epidemiologia delle infezioni urinarie

3.1 Prevalenza globale

3.2 Epidemiologia in Europa

3.3 Situazione italiana

3.4 Categorie maggiormente colpite

3.5 Implicazioni cliniche e terapeutiche

4. Diagnosi microbiologica delle infezioni urinarie

4.1 Esame delle urine

4.2 Urinocoltura

5. Caratteristiche di *Escherichia coli* uropatogeno

5.1 Fattori di virulenza

5.2 Genoma e plasticità genetica di UPEC

5.3 Classificazione dei ceppi di UPEC in base all'antigene O e rilevanza del clone ST131

6. Varianti di *Escherichia coli* non fermentanti il lattosio (NLF *E. coli*)

7. Operone *lac* e basi molecolari del fenotipo non fermentante il lattosio o Lac⁻

8. Antibiotici e antibiotico-resistenza in *Escherichia coli*

9. Nuove strategie terapeutiche contro *Escherichia coli*

10. Scopo del lavoro

11. Materiali e Metodi

11.1 Disegno dello studio

11.2 Criteri di inclusione ed esclusione

11.3 Setting dello studio

11.4 Raccolta dei dati e variabili analizzate

11.5 Raccolta, trasporto e processazione dei campioni urinari

11.6 Esame colturale e identificazione microbiologica

11.7 Caratterizzazione molecolare dei ceppi non fermentanti il lattosio (fenotipo Lac⁻)

11.8 Analisi statistica

12. Risultati

12.1 Caratteristiche generali della popolazione

12.2 Provenienza degli isolati

- 12.3 Distribuzione dei ceppi con fenotipo Lac⁺ e Lac⁻
- 12.4 Confronto del profilo di sensibilità tra i ceppi con fenotipo LAC⁺ e LAC⁻ del Policlinico San Martino
- 12.5 Confronto del profilo di sensibilità tra i ceppi con fenotipo LAC⁺ e LAC⁻ dell'Istituto Salus
- 12.6 Confronto del profilo di sensibilità tra il Policlinico San Martino e l'Istituto Salus
- 12.7 Distribuzione dei ceppi ESBL nei due contesti assistenziali
- 12.8 Analisi degli isolati del Policlinico San Martino in base alla provenienza dei pazienti
 - 12.8.1 Distribuzione dei ceppi con fenotipo Lac⁻ per provenienza
 - 12.8.2 Distribuzione dei ceppi ESBL per provenienza
 - 12.8.3 Profili di antibiotico-resistenza per provenienza nei ceppi con fenotipo Lac⁻
- 12.9 Sintesi delle analisi statistiche
- 12.10 Analisi genomica WGS di ceppi con fenotipo Lac⁻ selezionati

13. Discussione

Bibliografia

Abstract

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano una delle più comuni patologie infettive sia in ambito ospedaliero che comunitario, con un impatto significativo sulla salute pubblica, sulla qualità della vita dei pazienti e sui costi sanitari. Tra i principali agenti eziologici responsabili di tali infezioni, *Escherichia coli* riveste un ruolo predominante, essendo responsabile della maggior parte delle IVU non complicate e di una quota rilevante delle infezioni complicate e nosocomiali.

E' ben noto che la capacità di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) di colonizzare le vie urinarie e provocare infezioni dipende dall'azione coordinata di numerosi fattori di virulenza specifici. L'emergere di ceppi produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) negli anni '80 del secolo scorso e la crescente resistenza verso fluorochinoloni e altre classi antibiotiche che hanno dato luogo a ceppi MDR limitano le opzioni terapeutiche disponibili, soprattutto in ambito ospedaliero.

Tipicamente *E. coli* è un ceppo lac+, tuttavia alcuni studi hanno rilevato un aumento delle varianti lac- ed hanno evidenziato un'associazione con cloni internazionali. Particolare attenzione viene inoltre rivolta alle varianti emergenti di *Escherichia coli* uropatogeno, tra cui gli *Escherichia coli* non fermentanti il lattosio (Non-Lactose Fermenting *E. coli*, NLF *E. coli*), recentemente associati a importanti cloni internazionali ad alto rischio quali ST131 e ST1193.

Poiché negli ultimi anni abbiamo osservato un aumento dei ceppi con fenotipo lac- isolati dai campioni urinari si è voluto analizzare il fenomeno con il supporto dei dati fenotipici e genotipici non solo presso il Policlinico, ma anche coinvolgendo una struttura privata dove afferiscono esclusivamente pazienti comunitari per cercare di capire l'evoluzione del quadro epidemiologico.

1.Introduzione

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano una delle patologie infettive più frequenti a livello mondiale e costituiscono un importante problema di salute pubblica per l'elevata incidenza, la tendenza alle recidive e il significativo impatto economico e assistenziale. Si stima che milioni di persone sviluppino ogni anno almeno un episodio di infezione urinaria, con una maggiore prevalenza nel sesso femminile a causa di fattori anatomici e fisiologici che favoriscono la colonizzazione batterica del tratto urinario. Le IVU possono interessare differenti segmenti dell'apparato urinario, dalle basse vie urinarie, come uretra e vescica, fino alle alte vie urinarie, coinvolgendo ureteri e reni. Dal punto di vista clinico, esse vengono comunemente classificate in infezioni non complicate e complicate, nonché in infezioni acquisite in comunità e infezioni nosocomiali o correlate all'assistenza sanitaria. Tra queste ultime, particolare rilevanza assumono le infezioni urinarie associate a catetere (Catheter-Associated Urinary Tract Infections, CAUTI), che rappresentano una delle più frequenti infezioni correlate all'assistenza e costituiscono una significativa causa di morbidità nei pazienti ospedalizzati. Tra i numerosi microrganismi responsabili delle infezioni urinarie, *Escherichia coli* uropatogeno (Uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) rappresenta il principale agente eziologico. I ceppi UPEC derivano generalmente dal microbiota intestinale e possiedono numerosi fattori di virulenza che consentono loro di colonizzare il tratto urinario, persistere nell'ospite e causare infezioni.

La produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e la crescente resistenza verso i fluorochinoloni e altre classi antibiotiche limitano le opzioni terapeutiche disponibili, sia in ambito ospedaliero sia comunitario, rendendo sempre più problematica la gestione clinica di queste infezioni.

Pertanto, è necessario uno stretto monitoraggio epidemiologico per capire l'evoluzione del fenomeno, la diffusione di specifici meccanismi di resistenza, eventualmente veicolati da plasmidi e la diffusione di particolari cloni epidemici.

Le moderne tecniche di **Whole Genome Sequencing (WGS)** consentono di caratterizzare in maniera approfondita tali ceppi, identificando le alterazioni genetiche responsabili del fenotipo Lac- e valutando contestualmente la presenza di geni di virulenza, determinanti di antibiotico-resistenza, plasmidi e appartenenza a specifiche linee clonali. L'analisi genomica permette pertanto di stabilire se il fenotipo non fermentante rappresenti esclusivamente una variazione metabolica oppure costituisca un marker associato a particolari cloni ad alto rischio, come **ST131** e **ST1193**, frequentemente coinvolti nelle infezioni urinarie e nella diffusione della resistenza antimicrobica [97].

L'impiego di tecniche molecolari avanzate e del sequenziamento dell'intero genoma ha già consentito di identificare anche nel nostro Paese cloni particolarmente diffusivi di *E. coli* MDR associati alle infezioni urinarie come *E. coli* ST131.

Recentemente, abbiamo osservato presso il nostro laboratorio un incremento di *Escherichia coli* non fermentanti il lattosio (NLF *E. coli*), isolati da infezioni urinarie ma anche da infezioni invasive. Generalmente, le varianti non fermentanti il lattosio rappresentano una quota limitata di tutti gli *E. coli* isolati da campioni clinici per cui l'incremento osservato, seppur modesto, ha attratto la nostra attenzione. Scopo della tesi è stato valutare i dati epidemiologici riguardanti i ceppi di *E. coli* circolanti nella nostra realtà locale, sia in ambito nosocomiale sia comunitario e analizzare dal punto di vista molecolare alcuni di questi ceppi NLF per tipizzarli ed eventualmente spiegare le ragioni alla base del fenomeno.

1.1 Definizione e classificazione delle infezioni urinarie

Il sistema urinario è costituito da reni, ureteri, vescica e uretra, e la sua funzione principale è quella di filtrare il sangue eliminando prodotti di scarto ed eccessi di acqua. Inoltre, esso svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, contribuendo alla regolazione della concentrazione di ioni e soluti nel sangue, del volume ematico e della pressione arteriosa. In condizioni fisiologiche, le vie urinarie superiori sono considerate sterili, mentre recenti evidenze ottenute mediante tecniche molecolari avanzate hanno dimostrato la presenza di un microbiota urinario residente nel tratto urinario inferiore, il cui ruolo nella salute e nella malattia è ancora oggetto di studio.

Le Infezioni delle Vie Urinarie (IVU) rappresentano un ventaglio di patologie frequenti causate dalla presenza e moltiplicazione di microrganismi in una o più strutture dell'apparato urinario, cui si associa invasione tissutale. La loro classificazione può risultare complessa poiché richiede la valutazione di diversi elementi, tra cui la sede anatomica dell'infezione, la presentazione clinica, i fattori di rischio del paziente e i dati microbiologici. Per questo motivo, le IVU vengono suddivise secondo differenti criteri anatomici, clinici ed eziopatogenetici, al fine di orientare correttamente la diagnosi, la gestione terapeutica e la valutazione prognostica:

(Fig.1.1) [1, 2, 3]:

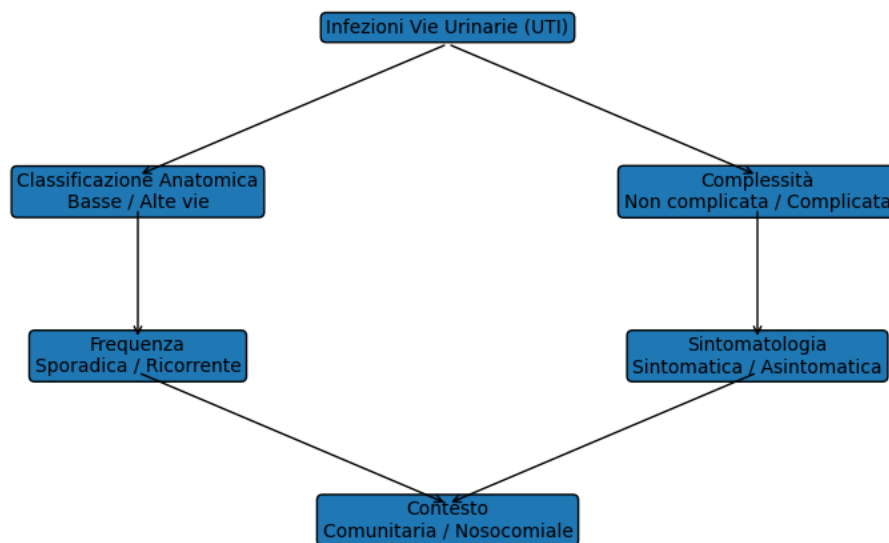


Fig.1.1: Classificazione delle infezioni delle vie urinarie

1.1.1. Classificazione anatomica

In base alla sede dell'infezione, le IVU si distinguono in:

- *Infezioni delle basse vie urinarie*, che coinvolgono uretra e vescica e comprendono:
 - uretrite
 - cistite
- *Infezioni delle alte vie urinarie*, che interessano ureteri e reni, tra cui:

- pielonefrite

Questa distinzione è clinicamente rilevante, poiché le infezioni delle alte vie sono generalmente associate a quadri più severi e a un maggiore rischio di complicanze sistemiche [1, 4].

1.1.2. *Classificazione in base alla complessità*

Le IVU possono essere suddivise in:

- *IVU non complicate*: sono infezioni delle vie urinarie che coinvolgono solo l'uretra e la vescica e non si estende ai reni o ad altre parti del sistema urinario, ovvero non sono presenti segni di propagazione dell'infezione ad altre parti del corpo. Questo tipo di infezione è considerato "non complicata" perché si verifica in individui sani, generalmente donne, senza malattie preesistenti o anomalie strutturali del sistema urinario. I sintomi tipici di un'infezione urinaria non complicata includono bruciore o dolore durante la minzione, frequenza urinaria aumentata, urgenza urinaria, dolore nella zona inferiore dell'addome e urina torbida o con presenza di sangue. Queste infezioni di solito vengono trattate con antibiotici per eliminare l'infezione e prevenire che si diffonda ad altre parti del sistema urinario [5].
- *IVU complicate*: sono infezione del tratto urinario che coinvolgono strutture anatomiche o funzionali che rendono difficile il trattamento o possono comportare complicanze gravi. Si manifestano in persone che presentano alterazioni dell'apparato urinario o con altri fattori di rischio, quali ad esempio soggetti portatori di catetere, donne in gravidanza o malati con insufficienza renale. Le strutture anatomiche coinvolte possono includere i reni, la prostata o le vie urinarie superiori. Possono essere causate da batteri più aggressivi o resistenti agli antibiotici, o possono essere associate a condizioni mediche preesistenti che predispongono l'individuo all'infezione. Il trattamento delle infezioni urinarie complicate di solito richiede una terapia antibiotica più lunga o più intensa rispetto alle infezioni urinarie non complicate [5].

1.1.3 *Classificazione in base alla frequenza:*

- *IVU sporadiche*: Episodi isolati senza precedenti recenti.
- *IVU ricorrenti*: Si definiscono tali quando si verificano:
 - ≥ 2 episodi in 6 mesi, oppure
 - ≥ 3 episodi in un anno

Le recidive possono essere dovute a reinfezione o a persistenza dello stesso ceppo batterico, spesso *Escherichia coli* [1,2].

1.1.4 *Classificazione in base alla sintomatologia:*

- *IVU sintomatiche*: Associate a segni e sintomi clinici (disuria, urgenza, febbre, ecc.).
- *Batteriuria asintomatica*: Presenza di una urinocoltura positiva con $\geq 10^5$ unità formanti colonia/mL in assenza di sintomi specifici. Tale condizione tende spesso a risolversi spontaneamente e, nella maggior parte dei casi, non richiede trattamento. Le IVU

asintomatiche devono essere trattate soltanto in situazioni selezionate, come nelle donne in gravidanza, nei pazienti neutropenici e nei soggetti sottoposti a chirurgia genitourinaria, poiché l'uso non necessario di antibiotici può favorire lo sviluppo di resistenze batteriche. [6]

1.1.5. Classificazione in base al contesto clinico:

- *IVU acquisite in comunità*: Insorgono al di fuori dell'ambiente ospedaliero e sono prevalentemente causate da *Escherichia coli*.
- *IVU nosocomiali (o associate all'assistenza sanitaria)*: particolare rilevanza assumono le Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTI), che rappresentano una delle più frequenti infezioni correlate all'assistenza sanitaria e sono spesso associate alla formazione di biofilm e alla diffusione di ceppi multiresistenti [7, 8, 9].

Le differenti forme cliniche delle IVU trovano una spiegazione nei meccanismi patogenetici che consentono ai microrganismi di colonizzare e persistere nel tratto urinario.

2. Patogenesi e Risposta immunitaria dell'ospite

La protezione contro le infezioni è normalmente sostenuta dal costante flusso di urine e dallo svuotamento regolare della vescica. Le urine sono un terreno di coltura poco permissivo per molti batteri per via del pH acido, dell'elevata concentrazione di urea, della variabilità dell'osmolarità urinaria e, nell'uomo, per la parziale attività antibatterica del secreto prostatico [10].

Nonostante queste barriere, i microrganismi possono raggiungere il tratto urinario attraverso diverse vie: ematogena, linfatica e ascendente. Tra queste, la via ascendente rappresenta il meccanismo più frequente e clinicamente rilevante. I ceppi uropatogeni colonizzano inizialmente la regione periuretrale provenendo dal microbiota intestinale, successivamente risalgono l'uretra e raggiungono la vescica grazie alla presenza di specifici fattori di adesione (Fig.2.1) [10, 11, 12].

L'adesione alle cellule uroepiteliali rappresenta uno dei passaggi fondamentali della patogenesi delle infezioni urinarie. I ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) esprimono specifici fattori di virulenza che consentono il legame all'urotelio, la colonizzazione del tratto urinario e la sopravvivenza nell'ambiente urinario, nonostante l'azione protettiva del flusso urinario. Dopo l'adesione, i batteri possono moltiplicarsi, invadere le cellule epiteliali e persistere nei tessuti urinari, favorendo l'instaurarsi dell'infezione e la comparsa di recidive [10].

L'interazione tra i fattori di virulenza di UPEC e i meccanismi di difesa dell'ospite determina l'evoluzione clinica dell'infezione. La capacità del batterio di aderire, invadere e persistere nei tessuti urinari attiva una complessa risposta immunitaria innata volta alla sua eliminazione [10, 13].

Se la risposta immunitaria dell'ospite non riesce a contenere la proliferazione batterica, l'infezione può estendersi dalle basse vie urinarie al tratto superiore, coinvolgendo reni e parenchima renale. In questi casi il danno tissutale può favorire il passaggio del microrganismo nel circolo ematico e determinare batteriemia o quadri settici [10, 11].

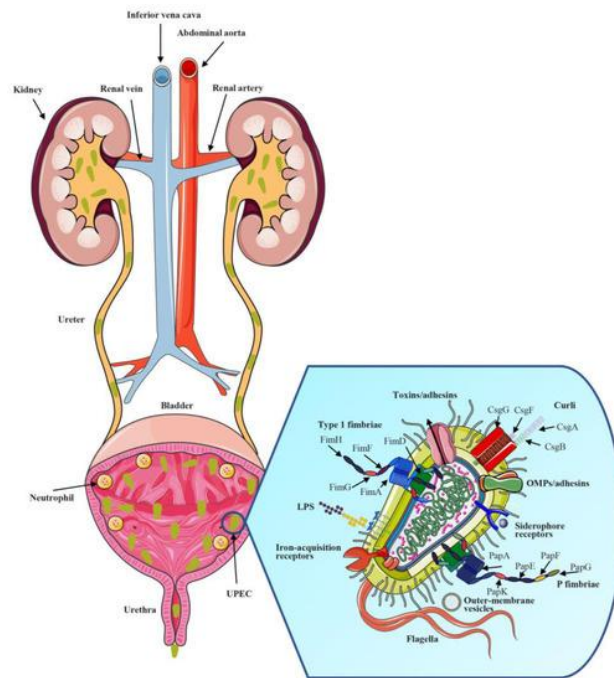


Figura 2.1 Meccanismo patogenetico di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC): colonizzazione ascendente dell'uretra, adesione all'urotelio e possibile progressione verso pielonefrite (Zhou et al.)

Nelle infezioni urinarie nosocomiali, in particolare nelle Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTI), la patogenesi presenta alcune peculiarità. La presenza del catetere urinario altera le normali difese meccaniche dell'ospite, favorisce la colonizzazione batterica e facilita la formazione di biofilm sulla sua superficie. Questo fenomeno promuove la persistenza dell'infezione, riduce l'efficacia della terapia antibiotica e contribuisce alla selezione di ceppi multiresistenti [8, 14, 15, 16].

Dal punto di vista immunologico, nonostante il tratto urinario sia frequentemente esposto a microrganismi provenienti dal microbiota intestinale, l'infezione non si sviluppa nella maggior parte dei casi grazie all'efficacia della risposta immunitaria innata [10, 13].

A livello vescicale, cellule immunitarie residenti come:

- macrofagi;
- mastociti;

svolgono una funzione essenziale nel riconoscimento dei patogeni e nell'attivazione della risposta infiammatoria.

Tali cellule coordinano il richiamo dei neutrofili, fondamentali per l'eliminazione batterica. Parallelamente, contribuiscono a limitare una risposta infiammatoria eccessiva che potrebbe danneggiare l'urotelio e favorire la persistenza dell'infezione.

La regolazione di questo equilibrio tra eliminazione del patogeno e protezione tissutale rappresenta uno degli aspetti più importanti nella fisiopatologia delle infezioni urinarie.

La risposta immunitaria innata rappresenta pertanto un elemento cruciale nella protezione dell'apparato urinario contro i ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) [10, 13].

3. Eziologia ed Epidemiologia delle infezioni urinarie

Nelle infezioni urinarie acquisite in comunità, UPEC è responsabile di circa il 70–90% dei casi, soprattutto nelle donne giovani e sessualmente attive (Tab. 3.1). In tali situazioni il microrganismo deriva generalmente dal microbiota intestinale del paziente e colonizza il tratto urinario attraverso una via ascendente [6, 10].

Nelle infezioni nosocomiali, invece, *Escherichia coli* continua a rappresentare il principale agente eziologico, ma con percentuali inferiori, generalmente comprese tra il 30% e il 50%, (Tab. 3.1) a causa della maggiore frequenza di altri patogeni opportunisti quali *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. ed *Enterococcus* spp.

3.1 Prevalenza globale

Le IVU interessano ogni anno circa 150 milioni di persone nel mondo e rappresentano una delle principali cause di prescrizione antibiotica in ambito territoriale [10]. Si stima che oltre il 50% delle donne sviluppi almeno un episodio di IVU nel corso della vita, mentre il 20–30% delle pazienti presenta episodi ricorrenti [11].

L'incremento dell'aspettativa di vita, la crescente diffusione delle procedure invasive e l'aumento della resistenza antimicrobica hanno determinato negli ultimi anni una progressiva crescita delle infezioni urinarie associate all'assistenza sanitaria [6, 8].

A livello mondiale, *Escherichia coli* è responsabile del 70–90% delle infezioni urinarie non complicate acquisite in comunità e di circa il 50% delle forme complicate (Tab 3.1)[10, 45].

L'ampia diffusione di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC), come già detto, è favorita dalla capacità di colonizzare il tratto urinario, dalla presenza di numerosi fattori di virulenza e dalla crescente comparsa di ceppi resistenti agli antibiotici [10, 11].

La distribuzione geografica di UPEC è relativamente uniforme, sebbene la prevalenza dei ceppi resistenti agli antibiotici mostri importanti differenze tra le varie aree del mondo, risultando generalmente più elevata in Asia, America Latina e in alcune regioni dell'Europa meridionale [48].

Negli ultimi due decenni la diffusione globale del clone pandemico ST131 ha profondamente modificato l'epidemiologia.

Sebbene il microrganismo responsabile sia spesso il medesimo, le caratteristiche epidemiologiche, microbiologiche e cliniche delle infezioni comunitarie e nosocomiali differiscono significativamente nei due contesti. In particolare, la diffusione di ceppi multiresistenti, la presenza di dispositivi invasivi e la pressione selettiva esercitata dall'uso degli antibiotici influenzano profondamente l'evoluzione delle infezioni nosocomiali rispetto a quelle comunitarie [6, 10].

3.2 Epidemiologia in Europa

In Europa le IVU rappresentano una delle principali cause di accesso alle cure primarie e alle strutture ospedaliere. I programmi europei di sorveglianza microbiologica hanno evidenziato un progressivo incremento della diffusione dei ceppi ESBL-produttori e delle resistenze ai principali antibiotici utilizzati nel trattamento delle IVU. I tassi più elevati di antibiotico-resistenza sono generalmente osservati nei Paesi dell'Europa meridionale e orientale, mentre i Paesi del Nord Europa mostrano livelli inferiori grazie a programmi consolidati di antimicrobial stewardship e a un utilizzo più controllato degli antibiotici [26].

3.3 Situazione italiana

In Italia le infezioni urinarie rappresentano una delle principali cause di prescrizione antibiotica sia in medicina generale sia in ambito ospedaliero. Studi epidemiologici nazionali confermano che *Escherichia coli* è responsabile di circa il 70–80% delle IVU comunitarie e di una quota significativa delle infezioni ospedaliere [49].

Negli ultimi anni è stato osservato un incremento dei ceppi produttori di ESBL, soprattutto nei pazienti anziani e nei soggetti con frequenti contatti con il sistema sanitario. Parallelamente si registra

un aumento della resistenza ai fluorochinoloni e alle cefalosporine di terza generazione, fenomeno che limita le opzioni terapeutiche disponibili [49, 50].

L'Italia rientra tra i Paesi europei con una prevalenza relativamente elevata di enterobatteri resistenti agli antibiotici, rendendo particolarmente importante il monitoraggio microbiologico e l'utilizzo appropriato della terapia antimicrobica [49, 51].

3.4 Categorie maggiormente colpite

Dal punto di vista clinico, la gravità dell'infezione è il risultato dell'interazione tra fattori di virulenza batterici di *Escherichia coli* e condizioni predisponenti dell'ospite.

Tra i fattori predisponenti più rilevanti figurano:

- ritenzione urinaria;
- reflusso vescico-ureterale;
- attività sessuale frequente;
- anamnesi familiare positiva;
- ipertrofia prostatica;
- atrofia vulvovaginale;
- incontinenza urinaria;
- prolasso genitale;
- elevato residuo post-minzionale.

Nella donna, la maggiore incidenza delle IVU è spiegata soprattutto da caratteristiche anatomiche: la brevità dell'uretra, la minore distanza tra meato uretrale e regione perianale e la diversa conformazione dell'apparato genitourinario facilitano infatti la risalita dei batteri enterici verso la vescica [13, 6]. Per questo motivo le infezioni urinarie risultano significativamente più frequenti nel sesso femminile in tutte le fasce d'età adulta.

Nel sesso maschile il rischio rimane generalmente inferiore fino alla sesta decade di vita; successivamente l'aumento della prevalenza di ipertrofia prostatica e di alterazioni ostruttive riduce questa differenza e contribuisce all'incremento delle infezioni.

I pazienti portatori di catetere urinario rappresentano una delle categorie a più alto rischio di IVU. Il rischio di batteriuria aumenta di circa il 3–7% per ogni giorno di permanenza del catetere e tende a raggiungere quasi il 100% nei pazienti sottoposti a cateterizzazione prolungata [10].

La formazione di biofilm sulla superficie del dispositivo favorisce la persistenza di UPEC e di altri microrganismi opportunisti, aumentando il rischio di infezioni recidivanti e antibiotico-resistenti [10]. Il diabete mellito rappresenta un importante fattore predisponente alle IVU. L'iperglicemia, le alterazioni della risposta immunitaria e le disfunzioni della vescica associate alla neuropatia diabetica favoriscono la colonizzazione batterica e la comparsa di infezioni più severe [12].

Nei pazienti diabetici si osserva inoltre una maggiore incidenza di pielonefrite, batteriemia e complicanze infettive rispetto alla popolazione generale [12].

I soggetti immunodepressi, inclusi pazienti oncologici, trapiantati e individui sottoposti a terapie immunosoppressive, presentano un aumentato rischio di IVU e di forme clinicamente più gravi [13]. La ridotta efficacia delle difese immunitarie facilita la colonizzazione persistente da parte di UPEC e aumenta il rischio di disseminazione sistemica, batteriemia e sepsi [13].

Le differenze epidemiologiche osservate nelle diverse categorie di pazienti influenzano non solo il rischio di sviluppare un'infezione urinaria, ma anche le modalità di presentazione clinica e la probabilità di essere coinvolti da microrganismi resistenti agli antibiotici. Nei pazienti anziani,

diabetici, immunodepressi o portatori di catetere urinario, le infezioni possono manifestarsi con quadri clinici atipici e risultare più frequentemente associate a ceppi multiresistenti. In questi contesti, una corretta diagnosi microbiologica assume un ruolo fondamentale per identificare l'agente eziologico responsabile, valutarne il profilo di sensibilità agli antimicrobici e impostare una terapia appropriata. Pertanto, l'impiego di metodiche diagnostiche accurate rappresenta uno strumento essenziale nella gestione delle infezioni urinarie sostenute da UPEC sia in ambito comunitario sia ospedaliero [10, 13].

3.5 Implicazioni cliniche e terapeutiche

Dal punto di vista clinico, le infezioni urinarie acquisite in comunità sono generalmente meno severe e rispondono più facilmente alla terapia antibiotica empirica, grazie alla minore prevalenza di ceppi multiresistenti e alla presenza di pazienti con un numero inferiore di fattori di rischio e comorbidità [6, 10]. Nella maggior parte dei casi, la diagnosi e il trattamento possono essere effettuati in ambito ambulatoriale, con una prognosi favorevole e una bassa incidenza di complicanze.

Le infezioni nosocomiali risultano invece più frequentemente associate a:

- recidive;
- complicanze;
- batteriemia;
- sepsi;
- ospedalizzazioni prolungate;
- aumento della mortalità [6, 8].

Per questo motivo, nelle IVU ospedaliere assume particolare importanza l'esecuzione dell'urinocoltura con antibiogramma prima dell'inizio della terapia antimicrobica quando le condizioni cliniche del paziente lo consentono [6].

Caratteristica	IVU comunitarie	IVU nosocomiali
Frequenza di UPEC	70–90%	30–50%
Fonte dell'infezione	Microbiota intestinale del paziente	Ambiente ospedaliero e dispositivi medici
Fattori di rischio principali	Attività sessuale, gravidanza, menopausa	Catetere urinario, ospedalizzazione, procedure invasive
Antibiotico-resistenza	Moderata	Elevata
Ceppi ESBL	Sempre più frequenti	Molto frequenti
Clone ST131	In aumento	Molto diffuso
Biofilm	Urotelio e IBC	Catetere urinario
Complicanze	Generalmente limitate	Più frequenti
Terapia empirica	Più efficace	Maggiore necessità di antibiogramma

Tabella 3.1: Confronto IVU comunitarie e IVU nosocomiali

Le differenze tra infezioni urinarie comunitarie e nosocomiali non riguardano solamente i fattori di rischio, i profili di antibiotico-resistenza e le caratteristiche dei pazienti coinvolti, ma anche i meccanismi attraverso cui l'infezione si sviluppa. In ambito ospedaliero, infatti, l'utilizzo di

dispositivi medici invasivi, in particolare del catetere urinario, rappresenta uno dei principali fattori predisponenti all'insorgenza delle infezioni urinarie [6, 10].

4. Diagnosi microbiologica delle infezioni

La diagnosi di infezione delle vie urinarie è una diagnosi clinica, basata sul rilievo di segni e sintomi specifici e non sulla ricerca di batteriuria e/o leucocituria. La diagnosi di laboratorio è finalizzata solo alla conferma di un fondato sospetto clinico [98].

Le principali metodiche impiegate comprendono generalmente l'esame chimico-fisico delle urine, l'urinocoltura, l'antibiogramma e metodiche microbiologiche e molecolari innovative come MALDI-TOF e PCR [6].

4.1 Esame delle urine

L'esame delle urine rappresenta il primo livello diagnostico nelle IVU. Esso comprende la valutazione fisica, chimica e microscopica del campione urinario.

Tra i principali parametri di interesse figurano:

- leucocituria;
- nitriti urinari;
- esterasi leucocitaria;
- ematuria;
- proteinuria.

La presenza di nitriti deriva dalla capacità di numerosi batteri Gram-negativi, tra cui *Escherichia coli*, di ridurre i nitrati urinari a nitriti. Sebbene la positività dei nitriti sia altamente suggestiva di infezione batterica, la loro assenza non esclude la presenza di IVU.

L'esame microscopico del sedimento urinario può evidenziare leucociti, batteri, eritrociti e cilindri urinari, fornendo ulteriori informazioni utili per l'inquadramento clinico del paziente [53, 54].

4.2 Urinocoltura

L'urinocoltura rappresenta il gold standard microbiologico per la diagnosi microbiologica delle infezioni urinarie [2].

L'esame consiste nella semina quantitativa dell'urina su terreni di coltura idonei e consente:

- l'isolamento del microrganismo responsabile;
- la quantificazione della carica batterica;
- l'identificazione della specie batterica;
- l'esecuzione successiva dell'antibiogramma [6, 55].

Tradizionalmente, una crescita $\geq 10^5$ UFC/mL (Unità Formanti Colonia per millilitro) è considerata significativa per la diagnosi di batteriuria. Tuttavia, in particolari condizioni cliniche, quali cistite acuta sintomatica o campioni ottenuti mediante cateterismo, anche conte inferiori possono assumere significato diagnostico [55, 56].

Nelle infezioni comunitarie, *Escherichia coli* rappresenta il microrganismo più frequentemente isolato, mentre nelle infezioni nosocomiali si osserva una maggiore eterogeneità microbiologica.

L'identificazione del germe deve sempre essere accompagnata da un antibiogramma per consentire una terapia mirata.

5. Caratteristiche di *Escherichia coli* uropatogeno

In *Escherichia coli* uropatogeno, (UPEC) la capacità di colonizzare l'apparato urinario, persistere nell'ospite e causare forme cliniche anche gravi dipende dall'azione coordinata di numerosi fattori di virulenza. Questi comprendono capsula polisaccaridica, fimbrie e adesine, tossine, sistemi di secrezione, proteine di membrana esterna, sistemi di acquisizione del ferro e capacità di formare biofilm e comunità intracellulari. Sono stati anche identificati specifici sierotipi e cloni associati alle infezioni urinarie.

5.1 Fattori di virulenza

Nel complesso, l'azione sinergica di adesione, invasione intracellulare, produzione di tossine, acquisizione del ferro, evasione immunitaria e formazione del biofilm spiega l'elevata capacità di UPEC di causare infezioni comunitarie e ospedaliere, recidive, fallimenti terapeutici e complicanze sistemiche. La crescente diffusione di ceppi multiresistenti rende questi fattori importanti anche come possibili bersagli per nuove strategie terapeutiche e vaccinali.

La **capsula polisaccaridica**, identificata mediante gli antigeni K, costituisce un rivestimento esterno protettivo. I sierotipi K1, K2, K5 e K92 sono frequentemente associati ai ceppi extraintestinali più virulenti. La capsula riduce l'opsonizzazione e la fagocitosi da parte di neutrofili e macrofagi e aumenta la resistenza al complemento. Contribuisce inoltre alla formazione del biofilm e alla persistenza batterica. Nei casi più severi favorisce la sopravvivenza nel sangue, la disseminazione sistemica e l'evoluzione verso pielonefrite, batteriemia e urosepsi.

Le **fimbrie e i pili** sono appendici proteiche superficiali indispensabili per l'adesione all'urotelio e permettono al batterio di resistere all'eliminazione meccanica prodotta dal flusso urinario. Le fimbrie di tipo 1 rappresentano uno dei principali fattori adesivi di UPEC. All'estremità della struttura è localizzata l'adesina FimH, che riconosce i residui di mannosio presenti sulle glicoproteine delle cellule uroepiteliali. Questa interazione consente la colonizzazione della vescica, favorisce la cistite, la formazione del biofilm e l'internalizzazione del batterio nelle cellule dell'urotelio.

Le **fimbrie P**, o Pap pili, sono invece associate soprattutto alle infezioni delle alte vie urinarie e alla pielonefrite. L'adesina terminale PapG riconosce recettori glicolipidici contenenti il motivo Gal α 1-4Gal, espressi sulle cellule dell'epitelio renale. La loro presenza facilita la colonizzazione del parenchima renale ed è correlata a infezioni ascendenti e quadri clinici più gravi. Altre strutture adesive comprendono le fimbrie S, che riconoscono residui contenenti acido sialico, e le fimbrie Dr, che si legano alla proteina CD55 delle cellule uroepiteliali e sono associate soprattutto alle infezioni persistenti o ricorrenti.

I pili di tipo IV partecipano all'adesione e all'aggregazione batterica, mentre il **pilus sessuale F** svolge un ruolo nella coniugazione e nel trasferimento orizzontale di plasmidi. Tale processo può favorire la diffusione di geni di virulenza e di antibiotico-resistenza, compresi quelli responsabili della produzione di β -lattamasi a spettro esteso.

Dopo l'adesione mediata da FimH, UPEC può penetrare nelle cellule superficiali della vescica e moltiplicarsi formando le **comunità batteriche intracellulari**, o IBC. Queste strutture organizzate ricordano un biofilm e proteggono i batteri sia dalla risposta immunitaria sia da numerosi antibiotici. Durante il loro sviluppo, i batteri formano microcolonie intracellulari e successivamente possono essere rilasciati nel lume vescicale, infettando nuove cellule.

UPEC può inoltre formare **reservoir intracellulari quiescenti**, denominati QIR. Si tratta di piccoli gruppi di batteri metabolicamente poco attivi, localizzati negli strati più profondi dell'urotelio, che possono persistere per lunghi periodi senza causare sintomi. In presenza di alterazioni delle difese locali o di danno dell'urotelio, questi batteri possono riattivarsi e provocare nuovi episodi infettivi. I QIR rappresentano quindi una delle principali spiegazioni biologiche delle infezioni urinarie ricorrenti.

Tra le tossine prodotte da UPEC, la più importante è la **α -emolisina HlyA**, appartenente alla famiglia delle tossine RTX. Essa viene secreta mediante un sistema di secrezione di tipo I e forma pori nelle membrane delle cellule dell'ospite, provocando alterazioni della permeabilità, squilibri ionici e lisi cellulare. Nell'apparato urinario determina danno dell'urotelio, facilita la diffusione del batterio negli strati più profondi e induce una risposta infiammatoria. HlyA può inoltre danneggiare neutrofili, monociti e macrofagi, riducendo l'efficacia delle difese immunitarie. I ceppi produttori sono frequentemente associati a pielonefrite, urosepsi e forme complicate.

Un'altra tossina rilevante è il **Cytotoxic Necrotizing Factor 1**, o CNF1, che modifica le proteine Rho GTPasi e altera profondamente il citoscheletro cellulare. Tale attività facilita l'adesione, l'invasione intracellulare e la persistenza batterica. UPEC può produrre anche autotrasportatori e proteasi della famiglia SPATE, tra cui la tossina Sat, dotata di attività citotossica nei confronti dell'urotelio.

I **sistemi di secrezione** consentono l'esportazione di tossine ed enzimi. Il sistema di tipo I, formato dalle proteine HlyB, HlyD e TolC, è responsabile della secrezione dell' α -emolisina. Il sistema di tipo V permette invece l'esportazione degli autotrasportatori coinvolti nell'adesione, nel biofilm e nella modulazione immunitaria. Il sistema di tipo II partecipa soprattutto all'adattamento metabolico, mentre il sistema di tipo III, tipico dei ceppi intestinali patogeni, ha generalmente un ruolo marginale in UPEC.

Un ulteriore elemento essenziale è rappresentato dai **sistemi di acquisizione del ferro**. Nell'ospite il ferro libero è scarsamente disponibile perché viene sequestrato da proteine come transferrina, lattoferrina e ferritina. Per superare questa forma di immunità nutrizionale, UPEC produce siderofori ad alta affinità e specifici recettori di membrana. I principali siderofori sono enterobactina, salmochelina, aerobactina e yersiniabactina. La salmochelina, diversamente dall'enterobactina, non viene riconosciuta dalla lipocalina-2 dell'ospite. I recettori IroN, IutA e FyuA consentono rispettivamente l'assorbimento di salmochelina, aerobactina e yersiniabactina, mentre ChuA permette di utilizzare il ferro derivato dall'eme. La presenza simultanea di più sistemi sideroforici aumenta la capacità di adattamento e la virulenza del batterio.

Infine, la formazione del **biofilm** rappresenta uno dei principali meccanismi di persistenza. Il biofilm è costituito da comunità batteriche immerse in una matrice extracellulare formata da polisaccaridi, proteine, lipidi e DNA. La matrice ostacola la penetrazione degli antibiotici, limita l'azione delle cellule immunitarie e favorisce la sopravvivenza di cellule metabolicamente inattive. Il fenomeno è particolarmente importante nelle infezioni associate a catetere, nelle quali il dispositivo offre una superficie favorevole all'adesione e diventa un serbatoio permanente di microrganismi.

5.2 Genoma e plasticità genetica di UPEC

Rispetto ai ceppi commensali intestinali, che fanno parte del microbiota fisiologico umano, UPEC presenta un patrimonio genetico più ampio e complesso, caratterizzato dalla presenza di geni

aggiuntivi coinvolti nella virulenza, nella sopravvivenza all'interno dell'apparato urinario e nell'adattamento a differenti pressioni ambientali [10, 12].

Dal punto di vista strutturale, il genoma di *Escherichia coli* è costituito da un **cromosoma circolare a doppio filamento di DNA**, con una dimensione media compresa tra **4,5 e 5,5 Mb**. Nei ceppi uropatogeni il genoma tende generalmente a essere più esteso rispetto ai ceppi intestinali non patogeni proprio per la presenza di regioni genomiche acquisite nel corso dell'evoluzione mediante trasferimento genetico orizzontale. Il numero complessivo di geni varia in base al ceppo considerato, ma nei ceppi UPEC si colloca generalmente tra **5.000 e 5.700 geni codificanti** [12,21].

Uno dei ceppi meglio studiati è **UPEC CFT073**, isolato da un caso di pielonefrite e batteriemia. Questo ceppo possiede un cromosoma di circa **5,23 Mb** con oltre **5.300 geni**, oltre a elementi genetici accessori che contribuiscono alla virulenza. Il confronto genomico tra CFT073 e i ceppi commensali intestinali ha dimostrato la presenza di numerose regioni specifiche coinvolte nella colonizzazione urinaria e nella patogenicità extraintestinale [21].

Una delle caratteristiche più rilevanti del genoma di UPEC è la presenza delle **pathogenicity islands (PAIs)**, ovvero isole di patogenicità. Si tratta di ampie regioni genomiche acquisite mediante trasferimento orizzontale che contengono gruppi di geni funzionalmente correlati alla virulenza. Queste regioni possono essere inserite in prossimità di geni tRNA e presentano spesso una composizione nucleotidica differente rispetto al resto del cromosoma. Tra i geni di virulenza presenti nelle isole di patogenicità figurano determinanti coinvolti nell'adesione all'urotelio, nella produzione di tossine e nell'acquisizione del ferro.

Accanto al cromosoma principale, molti ceppi uropatogeni possiedono anche **plasmidi**, molecole di DNA extracromosomico capaci di replicarsi autonomamente. I plasmidi possono contenere geni coinvolti nella virulenza e, soprattutto, nell'antibiotico-resistenza. La loro presenza ha particolare rilevanza clinica poiché consente la rapida acquisizione e diffusione di determinanti genetici attraverso trasferimento orizzontale tra batteri diversi [12, 13, 20].

Una caratteristica fondamentale del genoma di UPEC è infine la sua marcata **plasticità genomica**. Il patrimonio genetico di questi ceppi è altamente dinamico e può modificarsi attraverso:

- mutazioni spontanee;
- ricombinazione;
- inserzione di elementi mobili;
- acquisizione di plasmidi;
- trasferimento genetico orizzontale.

Questa capacità favorisce l'adattamento del microrganismo alle diverse condizioni ambientali e contribuisce alla comparsa di ceppi multiresistenti, particolarmente rilevanti nel contesto ospedaliero [10, 11,13].

Da quanto esposto emerge che il genoma di *Escherichia coli* uropatogeno rappresenta la base genetica della sua elevata capacità patogena. La presenza di isole di patogenicità, plasmidi e geni coinvolti nell'adesione, nella produzione di tossine, nell'acquisizione del ferro e nei meccanismi di adattamento conferisce a UPEC una notevole capacità di colonizzare il tratto urinario e causare infezioni persistenti. L'elevata plasticità genomica favorisce inoltre l'acquisizione e la diffusione di determinanti di virulenza e antibiotico-resistenza, contribuendo all'emergere di cloni ad alto rischio come ST131 [10, 13].

5.3. Classificazione dei ceppi di UPEC in base all'antigene O e rilevanza dei cloni ST131 e ST1193

La classificazione sierologica di *Escherichia coli* rappresenta uno strumento fondamentale per la caratterizzazione microbiologica ed epidemiologica dei diversi ceppi batterici. Nei ceppi UPEC la sierotipizzazione riveste particolare importanza poiché consente di identificare sierogruppi frequentemente associati alla colonizzazione del tratto urinario, alla virulenza extraintestinale e alla comparsa di infezioni ricorrenti o complicate [11, 12].

Tradizionalmente il sierotipo di *Escherichia coli* viene definito sulla base di tre principali antigeni superficiali (Fig.5.1): l'**antigene O**, localizzato nel lipopolisaccaride della membrana esterna; l'**antigene K**, associato alla capsula polisaccaridica; e l'**antigene H**, presente nei flagelli. Tra questi, l'antigene O rappresenta il principale criterio di classificazione sierologica ed è il determinante più frequentemente utilizzato per distinguere i diversi sierogruppi batterici [18].

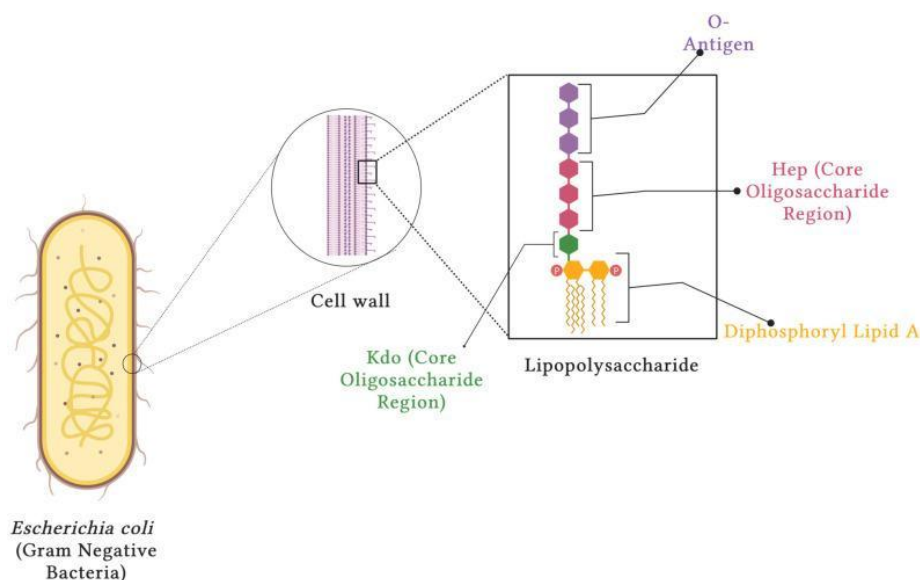


Figura 5.1: Struttura del lipopolisaccaride (LPS) della membrana esterna di *Escherichia coli*: lipide A, core polisaccaridico e antigene O.

Dal punto di vista strutturale, l'antigene O costituisce la porzione più esterna del **lipopolisaccaride (LPS)** della membrana esterna dei batteri Gram-negativi. Il lipopolisaccaride è formato dal **lipide A**, responsabile dell'attività endotossica, dal **core polisaccaridico** e dalla **catena polisaccaridica O**, esposta verso l'esterno e altamente variabile. La notevole eterogeneità strutturale di questa regione dipende dalla diversa composizione dei monosaccaridi e dalla loro organizzazione molecolare, rendendo l'antigene O il principale marker sierologico di *Escherichia coli*. Attualmente sono stati identificati oltre 180 sierogruppi O differenti [12, 17].

Nei ceppi uropatogeni alcuni sierogruppi risultano particolarmente rappresentati e mostrano una stretta associazione con le infezioni delle vie urinarie. Tra i più frequentemente isolati si riconoscono **O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18, O25 e O75**.

Tra questi, il sierotipo **O6** è storicamente considerato uno dei più frequentemente associati ai ceppi UPEC classici ed è stato spesso correlato a cistite, pielonefrite e infezioni urinarie ascendenti. Anche i sierotipi **O2** e **O18** risultano frequentemente associati ai ceppi extraintestinali e mostrano una maggiore capacità di colonizzazione e persistenza nel tratto urinario.

Di particolare rilievo clinico ed epidemiologico è il sierogruppo **O25**, frequentemente associato al clone **ST131** (*Sequence Type 131*), uno dei principali cloni di *Escherichia coli* uropatogeno diffusi a livello mondiale. La sigla ST131 deriva dalla classificazione **MLST** (**Multilocus Sequence Typing**), metodica di tipizzazione molecolare basata sull'analisi di geni housekeeping conservati [12, 17].

Il clone ST131 è generalmente associato al sierotipo **O25b:H4** ed è oggi considerato uno dei cloni pandemici di maggiore rilevanza in microbiologia clinica. Il suo interesse deriva non soltanto dall'ampia diffusione geografica, ma soprattutto dalla combinazione tra elevata virulenza e marcata antibiotico-resistenza [12, 17].

Dal punto di vista clinico, il clone ST131 è frequentemente associato alla produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), in particolare enzimi della famiglia CTX-M, e presenta spesso resistenza ai fluorochinoloni e ad altri antibiotici comunemente impiegati nel trattamento delle infezioni urinarie [4,5]. Per queste caratteristiche, ST131 rappresenta oggi uno dei principali responsabili delle infezioni urinarie da *Escherichia coli* multiresistente sia in ambito nosocomiale sia nella popolazione generale. Il riconoscimento di questo clone riveste pertanto particolare importanza dal punto di vista epidemiologico e clinico-terapeutico, poiché consente di correlare sierotipo, virulenza e profilo di resistenza antimicrobica. Il gene *blaCTX-M* è considerato uno dei determinanti genetici maggiormente coinvolti nella resistenza ai β -lattamici nei ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno [10, 11].

E. coli ST1193 è un altro clone emergente, multiresistente ai farmaci (MDR), diffuso a livello globale, causa di infezioni urinarie e di sepsi a esordio comunitario [99]. Sulla base della letteratura pubblicata recentemente sembra che questo clone stia seguendo il modello di diffusione pandemica di *E. coli* ST131, il clone MDR di maggior successo di tutti i tempi.

Dalle analisi filogenetiche risulta che entrambi i cloni siano emersi all'inizio degli anni Novanta acquisendo mutazioni nelle regioni determinanti la resistenza ai chinoloni (QRDR), plasmidi di tipo IncF, vari fattori di virulenza e il pilo di tipo 1 (*fimH*) a seguito di ricombinazione. Sono gli unici cloni MDR predominanti nelle popolazioni di *E. coli* non selezionate. Tra gli isolati di *E. coli* resistenti ai fluorochinoloni e alle cefalosporine, ST131 è il clone più frequente, mentre ST1193 è il secondo. Entrambi hanno svolto un ruolo fondamentale nella diffusione globale di *E. coli* MDR.

ST1193 ha avuto origine dal complesso clonale ST14 (STc14), appartiene al gruppo filogenetico B2 e al sierotipo O75. La prevalenza globale di ST1193 è in aumento dal 2012 e, in alcune regioni, questo clone sta persino sostituendo ST131.

I geni *blaCTX-M* si stanno diffondendo rapidamente tra gli isolati ST1193, secondo uno scenario analogo a quello verificatosi per *E. coli* ST131 negli anni Duemila.

La rapida comparsa di *E. coli* ST1193 è motivo di preoccupazione e contribuisce ad aggravare il carico per la sanità pubblica rappresentato dai cloni MDR di *E. coli*.

6. Varianti di *Escherichia coli* non fermentanti il lattosio

Sebbene *Escherichia coli* sia tradizionalmente considerato un batterio fermentante il lattosio, tuttavia una percentuale di isolati clinici (da <5% fino al 20%) presenta un fenotipo non fermentante (Lac⁻) [100, 101, 102]. Come illustrato nel capitolo dedicato all'operone *lac*, tale caratteristica è generalmente correlata ad alterazioni genetiche che interessano questo sistema di regolazione, in particolare il gene *lacY* e, più raramente, *lacZ* o altri elementi regolatori. I ceppi, definiti *Non-Lactose Fermenting Escherichia coli* (NLF *E. coli*), producono colonie incolore su agar MacConkey e possono essere facilmente confusi con altre *Enterobacterales* non fermentanti il lattosio, come le specie del genere *Shigella*.

Da un recente studio di epidemiologia genomica condotto in Bangladesh è emerso che tali ceppi possono avere caratteristiche di virulenza e profili di antibiotico-resistenza sovrapponibili a quelli degli *Escherichia coli* uropatogeni (UPEC) classici [28].

L'impiego del sequenziamento dell'intero genoma ha permesso di identificare, anche tra gli NLF *E. coli*, la presenza di importanti cloni internazionali ad alto rischio, tra cui ST131, ST1193, ST12, ST73 e ST167, già ampiamente associati alle infezioni urinarie complicate, alle batteriemie e alla diffusione globale della resistenza antimicrobica. In particolare, il clone ST131 continua a rappresentare uno dei principali responsabili delle infezioni urinarie sostenute da ceppi produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), mentre il clone ST1193 è considerato una delle linee emergenti di maggiore interesse epidemiologico.

Dal punto di vista clinico, questi ceppi presentano numerosi fattori di virulenza tipici degli UPEC, inclusi sistemi di adesione all'urotelio, meccanismi di acquisizione del ferro, tossine e fattori associati alla colonizzazione e alla persistenza nell'apparato urinario. Particolare rilevanza assume il profilo di antibiotico-resistenza osservato. Questi microrganismi possono presentare un fenotipo multidrug-resistant (MDR), con resistenza nei confronti di almeno tre differenti classi di antibiotici in particolar modo verso acido nalidixico, ciprofloxacina, ampicillina e cefalosporine di terza generazione. Inoltre, la frequente associazione con geni di resistenza, come *blaCTX-M-15* e, più raramente, *blaNDM-5*, evidenzia il loro potenziale ruolo nella diffusione di infezioni difficili da trattare sia in ambito ospedaliero sia nella comunità.

Un altro studio recente, condotto in Ungheria, sulle infezioni del tratto urinario ha dimostrato un tasso più alto di ceppi di *E. coli* NLF nei pazienti comunitari rispetto agli ospedalizzati e livelli di resistenza maggiori nei ceppi NLF rispetto ai fermentanti [103].

Gli NLF *E. coli* devono, pertanto, essere considerati patogeni emergenti di rilevante interesse clinico ed epidemiologico, considerata anche la rapida evoluzione del clone ST1193 NFL. Il loro corretto riconoscimento nei laboratori microbiologici e il monitoraggio delle principali linee clonali rappresentano strumenti fondamentali per il controllo della diffusione dell'antibiotico-resistenza e per una gestione terapeutica appropriata delle infezioni urinarie [28].

7. Operone *lac* e basi molecolari del fenotipo non fermentante il lattosio o Lac⁻

La capacità di *Escherichia coli* di fermentare il lattosio rappresenta una delle principali caratteristiche utilizzate nella diagnostica microbiologica per l'identificazione del microrganismo. Tale proprietà

dipende dall'espressione dei geni dell'operone ***lac***, un sistema di regolazione genica descritto per la prima volta da Jacob e Monod e considerato uno dei modelli fondamentali della biologia molecolare [95, 96] (Figura 7.1).

L'operone ***lac*** è costituito da tre geni strutturali principali: ***lacZ***, che codifica per la β -galattosidasi, enzima responsabile dell'idrolisi del lattosio in glucosio e galattosio; ***lacY***, che codifica per la lattosio permeasi, proteina di membrana deputata al trasporto del lattosio all'interno della cellula batterica; e ***lacA***, che codifica per la tiogalattoside transacetilasi, il cui ruolo fisiologico risulta meno rilevante nel metabolismo del lattosio e si ritiene contribuisca alla detossificazione di analoghi tossici del lattosio presenti nella cellula. L'espressione dell'operone è regolata da elementi di controllo quali il promotore, l'operatore e il gene regolatore ***lacI***, che modula la trascrizione in risposta alla disponibilità del substrato.

Nei ceppi di *E. coli* normalmente fermentanti, il corretto funzionamento dell'operone consente l'utilizzo del lattosio come fonte di carbonio, determinando la produzione di acidi organici evidenziabile nei terreni differenziali, come l'agar MacConkey, mediante la formazione di colonie rosa.

Al contrario, nei ceppi **Non-Lactose Fermenting (NLF)**, il fenotipo Lac⁻ è frequentemente associato ad alterazioni genetiche che interessano soprattutto il gene ***lacY***, con conseguente riduzione o perdita della funzionalità dell'enzima lattosio permeasi e incapacità del batterio di internalizzare il lattosio. Più raramente possono essere coinvolti anche ***lacZ*** o altri elementi regolatori dell'operone. In tali condizioni il batterio conserva tutte le caratteristiche tassonomiche di *Escherichia coli*, ma non fermenta il lattosio e produce colonie incolori sui terreni selettivi contenenti questo zucchero [97].

L'OPERONE *lac* IN *Escherichia coli*

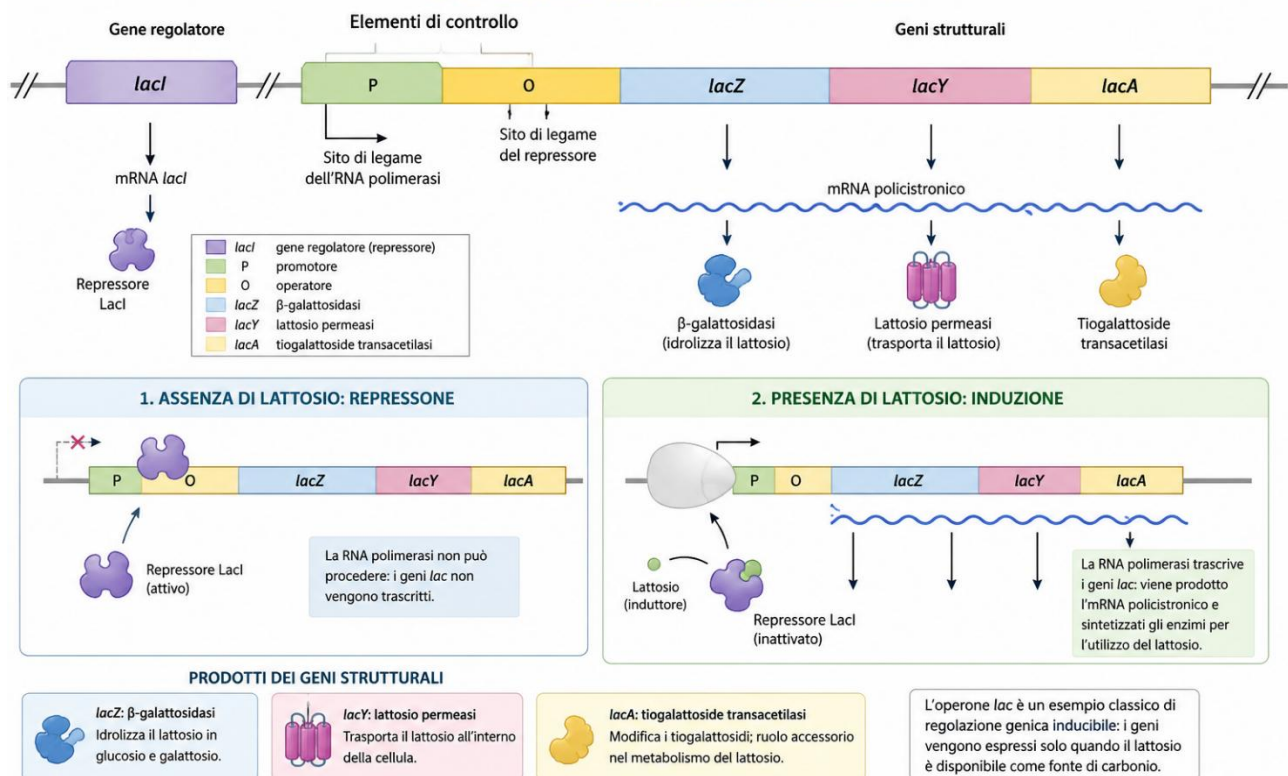


Figura 7.1: Schema dell'operone *lac* di *Escherichia coli* e sua regolazione. L'operone *lac* è costituito dal gene regolatore *lacI*, dal promotore (P), dall'operatore (O) e dai geni strutturali *lacZ*, *lacY* e *lacA*. L'espressione dell'operone è indotta dalla presenza di lattosio, che permette la sintesi della β -galattosidasi, della lattosio permeasi e della tiogalattoside transacetilasi. Alterazioni dei geni dell'operone, in particolare di *lacY* e più raramente di *lacZ*, possono determinare il fenotipo **non fermentante il lattosio (Lac-)**, oggetto di approfondimento mediante sequenziamento genomico nel presente studio.

8. Antibiotici e antibiotico-resistenza nei ceppi di *Escherichia coli*

Il trattamento delle infezioni urinarie da *Escherichia coli* uropatogeno si basa principalmente sull'impiego di antibiotici. Tuttavia, negli ultimi decenni, la crescente diffusione di ceppi resistenti ha progressivamente ridotto l'efficacia di numerose molecole tradizionalmente utilizzate nella pratica clinica [104].

La scelta dell'antibiotico varia in base a diversi fattori clinici, tra cui sede dell'infezione, gravità del quadro, eventuale presenza di complicanze, comorbidità del paziente e profilo locale di resistenza batterica. Nelle infezioni urinarie acute non complicate acquisite in comunità i farmaci più frequentemente impiegati comprendono nitrofurantoina, fosfomicina trometamolo e amoxicillina-clavulanato o alcune cefalosporine orali, mentre l'impiego dei fluorochinoloni è oggi più limitato a causa del progressivo aumento della resistenza e delle limitazioni legate alla sicurezza [6, 74].

Nei quadri clinici più complessi, come pielonefrite, infezioni urinarie complicate o infezioni correlate all'assistenza sanitaria, può essere necessario ricorrere a terapie antibiotiche più ampie, tra cui cefalosporine di terza generazione, aminoglicosidi, piperacillina/tazobactam e, nei casi sostenuti da ceppi multiresistenti, carbapenemici [6].

La crescente diffusione dell'antibiotico-resistenza nei ceppi di UPEC è legata a diversi meccanismi molecolari. Tra questi rivestono particolare importanza la produzione di enzimi inattivanti, la modifica dei bersagli antibiotici, la riduzione della permeabilità della membrana esterna, l'aumento delle pompe di efflusso e la capacità di acquisire geni di resistenza mediante plasmidi ed elementi genetici mobili. A questi si aggiunge la formazione del biofilm, che rappresenta un importante meccanismo di persistenza e protezione nei confronti sia della terapia antibiotica sia della risposta immunitaria dell'ospite [15, 70].

Uno dei meccanismi di resistenza più rilevanti nei ceppi uropatogeni è rappresentato dalla produzione di **β -lattamasi a spettro esteso (ESBL)**. Questi enzimi consentono al batterio di inattivare penicilline e cefalosporine di terza generazione, compromettendo l'efficacia di antibiotici frequentemente utilizzati nel trattamento delle infezioni urinarie.

Tra i principali determinanti di antibiotico-resistenza riscontrati nei ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC), il gene ***blaCTX-M*** riveste un ruolo di particolare rilievo clinico e microbiologico [26, 70]. Questo gene codifica per una **β -lattamasi a spettro esteso (Extended Spectrum β -Lactamase, ESBL)** appartenente alla famiglia CTX-M, enzimi capaci di idrolizzare numerosi antibiotici β -lattamici, in particolare cefalosporine di terza generazione come cefotaxime, ceftriaxone e ceftazidime [11, 24].

Il nome **CTX-M** deriva dalla spiccata attività enzimatica nei confronti del **cefotaxime**. Il genere *Kluyvera* è considerato il probabile serbatoio ancestrale di questi geni. Attraverso eventi di trasferimento genetico orizzontale, i geni *blaCTX-M* sono stati acquisiti da differenti *Enterobacteriaceae* e si sono diffusi ampiamente in *Escherichia coli*, in particolare nei ceppi extraintestinali e uropatogeni [24, 25].

Dal punto di vista molecolare, i geni *bla*CTX-M sono frequentemente localizzati su **plasmidi trasferibili**, spesso associati a elementi genetici mobili come trasposoni e sequenze d'inserzione. Questa organizzazione facilita la rapida diffusione dei determinanti di resistenza sia tra ceppi appartenenti alla stessa specie sia tra specie batteriche differenti. Nei ceppi UPEC questo meccanismo ha favorito un'importante espansione della resistenza antimicrobica, soprattutto in ambito ospedaliero ma sempre più frequentemente anche in comunità [11, 24].

Tra i diversi gruppi di CTX-M, **CTX-M-15** rappresenta la variante maggiormente associata ai ceppi uropatogeni ed è attualmente considerata una delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) più diffuse a livello mondiale. La sua rilevanza clinica deriva non solo dalla capacità di conferire resistenza alle cefalosporine di terza generazione, ma anche dalla frequente associazione con ulteriori determinanti genetici di resistenza localizzati sugli stessi plasmidi.

Nei ceppi UPEC produttori di CTX-M si osserva frequentemente una concomitante resistenza a diverse classi antibiotiche, tra cui fluorochinoloni, trimetoprim-sulfametossazolo, aminoglicosidi e penicilline ad ampio spettro. Tale fenomeno contribuisce alla comparsa di ceppi multidrug-resistant (MDR), associati a una maggiore complessità terapeutica e a un aumento del rischio di insuccesso clinico.

Dal punto di vista clinico, la presenza del gene *bla*CTX-M è correlata a una maggiore probabilità di recidiva dell'infezione, persistenza batterica, ospedalizzazione e necessità di ricorrere ad antibiotici a più ampio spettro, con conseguente incremento della pressione selettiva e della diffusione di ceppi multiresistenti [25, 26].

La diffusione di *bla*CTX-M ha profondamente modificato l'epidemiologia delle infezioni urinarie da UPEC. Sebbene i ceppi produttori di ESBL fossero inizialmente confinati all'ambiente ospedaliero, negli ultimi decenni la loro presenza è aumentata progressivamente anche nelle infezioni comunitarie, contribuendo alla diffusione globale della resistenza ai β -lattamici. In questo contesto, alcuni cloni ad alto rischio, tra cui ST131, hanno svolto un ruolo determinante nella disseminazione internazionale dei geni *bla*CTX-M [13, 26].

La presenza di geni ESBL si associa frequentemente a resistenza contemporanea verso altre classi antibiotiche, in particolare fluorochinoloni, trimetoprim-sulfametossazolo e aminoglicosidi, determinando profili di **multiresistenza**. Tale fenomeno riduce progressivamente le opzioni terapeutiche disponibili e rappresenta una delle principali criticità nella pratica clinica [26, 70].

Tra le classi maggiormente coinvolte vi sono i **fluorochinoloni**, per lungo tempo largamente impiegati nelle infezioni urinarie. La resistenza a questi antibiotici può svilupparsi attraverso mutazioni dei geni bersaglio, in particolare *gyrA* e *parC*, ma anche tramite meccanismi plasmidici e alterazioni della permeabilità batterica [70].

Anche **trimetoprim-sulfametossazolo**, storicamente utilizzato nel trattamento delle infezioni urinarie non complicate, mostra in molte aree geografiche una crescente riduzione di efficacia, con conseguente necessità di un utilizzo più selettivo sulla base dei dati epidemiologici locali e dell'antibiogramma [6, 74].

Un ruolo particolarmente importante nella diffusione della resistenza è svolto dalla capacità di UPEC di formare **biofilm**, soprattutto nelle infezioni urinarie ricorrenti e nelle infezioni associate a catetere urinario. All'interno del biofilm i batteri risultano immersi in una matrice extracellulare che limita la penetrazione degli antibiotici, riduce l'attività metabolica e favorisce la sopravvivenza batterica nel

tempo. Questo meccanismo contribuisce in modo significativo alla persistenza dell'infezione e alla comparsa di recidive [10, 15].

Dal punto di vista epidemiologico ha assunto particolare rilievo il clone **ST131**, frequentemente associato al sierotipo **O25b:H4**, oggi considerato uno dei principali cloni pandemici di *Escherichia coli* uropatogeno. Questo clone presenta spesso elevata capacità di diffusione e una marcata associazione con la produzione di β -lattamasi CTX-M, in particolare **CTX-M-15**, oltre a resistenza ai fluorochinoloni e ad altre classi antibiotiche [26, 71].

La diffusione di ST131 interessa sia l'ambito ospedaliero sia quello territoriale e rappresenta uno dei principali fattori coinvolti nell'aumento delle infezioni urinarie sostenute da ceppi multiresistenti.

Dal punto di vista clinico, la crescente antibiotico-resistenza nei ceppi di UPEC è associata a un maggiore rischio di fallimento terapeutico, prolungamento dell'infezione, aumento delle recidive e incremento della necessità di ospedalizzazione. Per questo motivo il monitoraggio microbiologico e l'esecuzione dell'antibiogramma rivestono un ruolo fondamentale nella scelta terapeutica e nella gestione clinica del paziente [26, 71].

Nel complesso, *Escherichia coli* uropatogeno mantiene un ruolo predominante nelle infezioni delle vie urinarie, ma la crescente diffusione di ceppi resistenti rappresenta oggi una delle principali criticità cliniche e microbiologiche. La conoscenza dei meccanismi di antibiotico-resistenza e l'impiego appropriato della terapia antimicrobica risultano pertanto essenziali per migliorare l'efficacia terapeutica e contenere la diffusione di ceppi multiresistenti.

Nei ceppi UPEC appartenenti al clone ST131 la presenza di plasmidi in grado di codificare per la resistenza a molteplici antibiotici rappresenta uno dei principali fattori responsabili della diffusione globale dell'antibiotico-resistenza [26, 71].

Negli ultimi anni l'evoluzione dell'antibiotico-resistenza nei ceppi di *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) ha evidenziato la comparsa di meccanismi sempre più complessi, in grado di compromettere l'efficacia di numerose classi di antibiotici. Sebbene le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), in particolare quelle appartenenti alla famiglia CTX-M, rappresentino ancora il principale determinante di resistenza nelle infezioni urinarie, l'emergere di carbapenemasi e di plasmidi multiresistenti costituisce una crescente minaccia per la salute pubblica [75, 76].

Tra le carbapenemasi di maggiore rilevanza clinica si distingue la New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM), identificata per la prima volta nel 2008. Gli enzimi NDM appartengono alla classe B delle β -lattamasi e sono in grado di idrolizzare quasi tutti gli antibiotici β -lattamici, inclusi i carbapenemi, considerati per lungo tempo farmaci di ultima linea per il trattamento delle infezioni da enterobatteri multiresistenti [76, 77].

I geni *blaNDM* sono generalmente localizzati su plasmidi trasferibili e possono diffondersi rapidamente tra differenti specie batteriche. Sebbene *Klebsiella pneumoniae* rappresenti il principale serbatoio di questi geni, numerosi casi di infezioni urinarie sostenute da ceppi UPEC produttori di NDM sono stati descritti in tutto il mondo. La presenza di tali enzimi limita drasticamente le opzioni terapeutiche disponibili e spesso richiede l'impiego di associazioni antibiotiche complesse [77, 78]. Le carbapenemasi di tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*) appartengono alla classe A delle β -lattamasi e rappresentano una delle principali cause di resistenza ai carbapenemi negli Enterobacterales [76, 77].

I geni *blaKPC* sono frequentemente localizzati su plasmidi mobili e possono essere trasferiti tra specie differenti. Sebbene originariamente associati a *Klebsiella pneumoniae*, negli ultimi anni sono stati identificati sempre più frequentemente anche in ceppi di *Escherichia coli*, inclusi isolati

uropatogeni. La diffusione di KPC comporta un importante aumento della mortalità e della complessità terapeutica nelle infezioni gravi [75, 77].

Le carbapenemasi appartenenti alla famiglia OXA-48-like costituiscono un ulteriore gruppo di enzimi emergenti negli *Enterobacterales*. Queste β -lattamasi appartengono alla classe D e presentano una capacità variabile di idrolizzare i carbapenemi.

Uno degli aspetti più problematici delle OXA-48-like è rappresentato dalla difficoltà diagnostica, poiché tali enzimi possono determinare livelli relativamente bassi di resistenza fenotipica, rendendo più complessa la loro identificazione nei laboratori microbiologici [76, 77].

Negli ultimi anni la diffusione di ceppi produttori di OXA-48 è stata documentata in numerosi Paesi europei, inclusa l'Italia [49].

L'emergere di carbapenemasi quali NDM, KPC e OXA-48-like, associate alla crescente diffusione di plasmidi multiresistenti, evidenzia la continua evoluzione genetica di *Escherichia coli* uropatogeno. Tali fenomeni stanno progressivamente riducendo le opzioni terapeutiche disponibili e sottolineano l'importanza di:

- sorveglianza microbiologica continua;
- identificazione molecolare dei determinanti di resistenza;
- programmi di antimicrobial stewardship;
- sviluppo di nuovi antibiotici;
- strategie terapeutiche alternative, quali batteriofagi, antiadesine e vaccini [11, 75].

L'emergere di ceppi UPEC produttori di ESBL e carbapenemasi ha favorito lo sviluppo di nuove associazioni antibiotiche in grado di contrastare i principali meccanismi di resistenza.

Tra le molecole di più recente introduzione figurano:

- ceftazidime-avibactam;
- meropenem-vaborbactam;
- imipenem-relebactam;
- cefiderocol [4, 93].

Questi farmaci mostrano attività nei confronti di numerosi enterobatteri multiresistenti e rappresentano importanti opzioni terapeutiche nelle infezioni urinarie complicate sostenute da ceppi produttori di β -lattamasi.

Particolarmente interessante è il cefiderocol, una cefalosporina siderofora che sfrutta i sistemi di acquisizione del ferro del batterio per penetrare all'interno della cellula microbica, aggirando alcuni meccanismi di resistenza [93, 94].

9. Nuove strategie terapeutiche contro *Escherichia coli*

L'aumento della diffusione di ceppi UPEC multiresistenti agli antibiotici, associato alla crescente prevalenza di cloni ad alta diffusione come ST131, rappresenta una delle principali sfide della microbiologia clinica moderna. La progressiva riduzione dell'efficacia delle terapie convenzionali ha stimolato lo sviluppo di approcci innovativi finalizzati a prevenire la colonizzazione batterica, ridurre la virulenza del patogeno e limitare l'impiego degli antibiotici tradizionali [10, 13].

Tra le strategie preventive più promettenti vi è lo sviluppo di vaccini diretti contro i principali fattori di virulenza di UPEC.

Particolare interesse è stato rivolto all'adesina FimH, localizzata all'estremità delle fimbrie di tipo 1. Questa proteina svolge un ruolo fondamentale nell'adesione del batterio alle cellule uroepiteliali e rappresenta uno dei primi passaggi della patogenesi delle infezioni urinarie.

Studi sperimentali hanno dimostrato che l'immunizzazione contro FimH è in grado di ridurre significativamente la colonizzazione vescicale e la comparsa di infezioni urinarie in modelli animali. Sebbene non siano ancora disponibili vaccini approvati per l'uso clinico, diversi candidati vaccinali sono attualmente oggetto di sperimentazione [13, 81].

Un altro approccio innovativo consiste nell'inibizione dell'adesione batterica alle cellule dell'urotelio tramite i mannosidi, piccole molecole sintetiche progettate per legarsi all'adesina FimH, impedendo il riconoscimento dei residui di mannosio presenti sulla superficie delle cellule uroepiteliali [10, 81]. Bloccando questa interazione, i mannosidi riducono la capacità di UPEC di aderire alla mucosa urinaria e favoriscono l'eliminazione dei batteri attraverso il flusso urinario. A differenza degli antibiotici convenzionali, tali molecole non esercitano una pressione selettiva diretta sulla crescita batterica, riducendo teoricamente il rischio di sviluppo di resistenze [13, 82].

La fagoterapia rappresenta una delle strategie terapeutiche più studiate per il trattamento delle infezioni sostenute da batteri multiresistenti [83, 84].

I batteriofagi sono virus in grado di infettare selettivamente i batteri e di provocarne la lisi. Grazie alla loro elevata specificità, i fagi possono eliminare ceppi patogeni di UPEC preservando gran parte del microbiota commensale [83, 85].

Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato l'efficacia dei batteriofagi contro ceppi produttori di ESBL e carbapenemasi, inclusi isolati appartenenti al clone ST131 [84, 86]. Tuttavia, la standardizzazione dei protocolli terapeutici e la definizione delle modalità di somministrazione rappresentano ancora importanti sfide per la diffusione clinica di questa strategia [83, 87].

Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse anche per il ruolo del microbiota urinario e intestinale nella prevenzione delle infezioni urinarie [88, 89].

L'utilizzo di probiotici, in particolare ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mira a ristabilire l'equilibrio della flora microbica e a contrastare la colonizzazione da parte dei patogeni uropatogeni [89,90].

Alcuni studi suggeriscono che la somministrazione di probiotici possa ridurre la frequenza delle infezioni urinarie ricorrenti, soprattutto nelle donne in post-menopausa. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi clinici per confermare definitivamente la loro efficacia [88,90].

Infine, numerose ricerche sono orientate verso lo sviluppo di molecole in grado di interferire con la formazione o la stabilità del biofilm. Tra gli approcci studiati figurano:

- enzimi degradanti la matrice extracellulare;
- peptidi antimicrobici;
- nanoparticelle;
- inibitori del quorum sensing;
- rivestimenti anti-biofilm per dispositivi medici.

Tali strategie potrebbero risultare particolarmente utili nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni associate a catetere urinario (CAUTI) [10, 15, 92].

10. Scopo del lavoro

Il presente studio si propone di analizzare e confrontare gli isolati urinari di *Escherichia coli* provenienti da pazienti afferenti all'Ospedale Policlinico San Martino di Genova e all'Istituto Salus – Alliance Medical di Genova, al fine di evidenziare eventuali differenze nella distribuzione dei ceppi circolanti in due realtà diverse del nostro territorio e nei contesti nosocomiale e comunitario.

Per ciascun isolato sono stati raccolti i principali dati microbiologici e demografici, comprendenti il fenotipo di fermentazione del lattosio (Lac+/Lac-), il sesso e l'età del paziente e la provenienza del campione.

Particolare attenzione è stata rivolta ai ceppi non fermentanti il lattosio NLF fenotipo (Lac-), variante fenotipica emergente di crescente interesse clinico ed epidemiologico, frequentemente associata in letteratura a linee clonali ad alto rischio, quali ST131 e ST1193, e a determinanti genetici di antibiotico-resistenza, tra cui il gene *blaCTX-M*.

Lo studio ha avuto l'obiettivo di valutare la prevalenza dei ceppi Lac- tra gli isolati urinari di *Escherichia coli* nei due contesti assistenziali e di caratterizzarne il profilo di sensibilità agli antimicrobici, con particolare riferimento ai β -lattamici, ai fluorochinoloni e alle altre principali classi di antibiotici impiegate nel trattamento delle infezioni delle vie urinarie. È stato inoltre effettuato un confronto dei profili di antibiotico-resistenza dei ceppi Lac- isolati presso il Policlinico San Martino e l'Istituto Salus – Alliance Medical, al fine di evidenziare eventuali differenze epidemiologiche tra i due setting assistenziali.

Infine, cinque isolati con fenotipo Lac- selezionati per diversi antibiotipi e provenienza sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante Whole Genome Sequencing (WGS), con l'obiettivo di identificare le principali linee clonali, i determinanti genetici di antibiotico-resistenza e i fattori di virulenza ad essi associati.

L'analisi complessiva dei dati ottenuti mira a fornire informazioni utili sulla diffusione dei ceppi uropatogeni non fermentanti il lattosio nei contesti nosocomiale e comunitario, contribuendo alla sorveglianza epidemiologica locale, all'ottimizzazione delle strategie di antimicrobial stewardship e alla definizione di approcci diagnostici e terapeutici più appropriati per la gestione delle infezioni delle vie urinarie.

11. Materiali e Metodi

11.1 Disegno dello studio

È stato condotto uno studio osservazionale comparativo con componente retrospettiva e prospettica. La popolazione in studio era costituita da tutti gli isolati urinari di *Escherichia coli* inclusi secondo i criteri descritti nel paragrafo successivo.

Per l'anno 2025, i dati microbiologici sono stati raccolti retrospettivamente mediante consultazione del database gestionale dell'Istituto Salus. Per il periodo compreso tra gennaio e maggio 2026, la raccolta dei dati è stata effettuata prospetticamente, mediante registrazione progressiva degli isolati urinari di *Escherichia coli* processati nei due laboratori e delle relative informazioni microbiologiche.

11.2 Criteri di inclusione ed esclusione

Sono stati inclusi tutti gli isolati urinari di *Escherichia coli* ottenuti da urinocolture positive processate nel periodo compreso tra gennaio 2025 e maggio 2026. Per ciascun episodio infettivo è stato considerato un solo isolato per paziente, al fine di evitare duplicazioni nelle analisi epidemiologiche. Sono stati pertanto esclusi gli isolati duplicati riferibili allo stesso episodio infettivo.

11.3 Setting dello studio

Lo studio è stato condotto presso due differenti realtà sanitarie della città di Genova: il Laboratorio di Microbiologia dell'**Ospedale Policlinico San Martino** e il Laboratorio di Microbiologia dell'**Istituto Salus – Alliance Medical**.

L'Ospedale Policlinico San Martino rappresenta un'Azienda Ospedaliero-Universitaria di riferimento regionale e nazionale, caratterizzata da un'elevata complessità assistenziale e dalla presenza di numerose specialità cliniche e chirurgiche. Presso tale struttura afferiscono sia pazienti in regime di ricovero sia comunitari (utenti ambulatoriali e afferenti del Pronto Soccorso). Questo setting ha consentito l'analisi di isolati urinari provenienti da differenti contesti assistenziali, comprendendo reparti di degenza, Pronto Soccorso e pazienti esterni, permettendo così di valutare il profilo microbiologico in una popolazione eterogenea con differente grado di complessità clinica.

L'Istituto Salus – Alliance Medical è una struttura sanitaria privata accreditata con il Servizio Sanitario Nazionale, prevalentemente dedicata all'attività ambulatoriale e diagnostica. Tale contesto rappresenta un'importante realtà territoriale, in cui gli isolati urinari derivano prevalentemente da pazienti provenienti dalla comunità, consentendo di descrivere le caratteristiche microbiologiche delle infezioni urinarie in ambito extraospedaliero.

Il confronto tra i due setting ha permesso di analizzare eventuali differenze nei profili di sensibilità agli antimicrobici degli isolati di *Escherichia coli* e nella prevalenza dei ceppi lattosio non fermentanti (LAC-). Tale approccio ha quindi consentito di valutare l'eventuale influenza del contesto assistenziale sull'epidemiologia microbiologica e sui pattern di antibiotico-resistenza degli isolati.

11.4 Raccolta dei dati e variabili analizzate

I dati microbiologici sono stati estratti dai software gestionali utilizzati nei due laboratori e raccolti in un database dedicato, predisposto per la successiva elaborazione e analisi dei dati.

Per ciascun isolato sono state registrate le principali informazioni microbiologiche e alcune informazioni demografiche comprendenti l'anno di isolamento, la struttura sanitaria di provenienza, il sesso e l'età del paziente, la provenienza del campione (paziente ricoverato, paziente comunitario afferente al Pronto Soccorso o paziente esterno), il fenotipo di fermentazione del lattosio (Lac+/Lac-), il profilo di sensibilità agli antimicrobici ottenuto mediante antibiogramma degli antibiotici testati e, ove disponibile, il fenotipo produttore di β -lattamasi a spettro esteso (*Extended-Spectrum β -Lactamase*, ESBL). Per gli isolati provenienti dall'Istituto Salus – Alliance Medical, in assenza di una classificazione microbiologica specifica, è stata inoltre effettuata un'identificazione dei ceppi con fenotipo compatibile con ESBL sulla base del profilo di sensibilità alle cefalosporine di terza generazione.

11.5 Raccolta, trasporto e processazione dei campioni urinari

I campioni urinari destinati all'esame colturale sono stati raccolti in contenitori sterili monouso e identificati mediante etichettatura univoca, secondo le procedure operative adottate presso le strutture

coinvolte nello studio. Successivamente, i campioni sono stati trasportati ai rispettivi Laboratori di Microbiologia per l'esecuzione delle analisi microbiologiche.

Qualora il processamento non fosse stato eseguito immediatamente dopo l'accettazione, i campioni sono stati conservati secondo le procedure operative vigenti presso ciascun laboratorio, nel rispetto delle condizioni previste per garantire la stabilità microbiologica del campione fino all'esecuzione dell'urinocoltura.

11.6 Esame colturale e identificazione microbiologica

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Policlinico San Martino, le urinocolture sono state sottoposte a screening microbiologico mediante il sistema automatizzato Uroquik, eseguito con l'analizzatore Alfred 60 (Alifax, Padova, Italia). Il sistema consente il monitoraggio della crescita batterica mediante rilevazione della torbidità attraverso tecnologia laser scatter, permettendo l'identificazione rapida dei campioni con probabile crescita batterica significativa.

I campioni risultati positivi allo screening sono stati seminati mediante ansa calibrata da 1 µL su CHROMagar™ Detection e agar sangue, quindi incubati in aerobiosi a 37 °C per 18–24 ore.

In presenza di crescita batterica significativa, gli isolati sono stati sottoposti a identificazione microbiologica e a test di sensibilità agli antimicrobici secondo le procedure descritte nel paragrafo 17.6.

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Salus – Alliance Medical, i campioni urinari sono stati processati mediante il sistema Uriline Enterococcus 3, costituito da dip-slide rivestiti con tre differenti terreni colturali: CLED agar (Cystine Lactose Electrolyte Deficient), MacConkey agar e D-Coccosel agar.

Dopo l'accettazione e la registrazione nel sistema gestionale di laboratorio, i supporti colturali sono stati immersi direttamente nel campione urinario e successivamente incubati a 35-37 °C per 18-24 ore in aerobiosi. Al termine dell'incubazione, la crescita batterica è stata valutata mediante lettura delle colonie sviluppatesi sui diversi terreni, consentendo una stima semiquantitativa della carica microbica e una prima caratterizzazione dei microrganismi isolati.

Il terreno CLED ha consentito la crescita della maggior parte degli uropatogeni e la differenziazione dei batteri fermentanti il lattosio da quelli non fermentanti; il terreno MacConkey è stato utilizzato per la selezione e differenziazione dei batteri Gram-negativi enterici, mentre il terreno D-Coccosel ha favorito l'isolamento selettivo degli enterococchi.

La crescita osservata sul terreno differenziale MacConkey ha inoltre consentito una prima valutazione del fenotipo di fermentazione del lattosio dei ceppi di *Escherichia coli*, permettendo la distinzione tra isolati fermentanti (*lac*+) e non fermentanti (*lac*-), successivamente inclusi nell'analisi comparativa dello studio.

Gli isolati batterici ottenuti dalle urinocolture positive sono stati sottoposti a identificazione microbiologica e a test di sensibilità agli antimicrobici secondo le procedure operative adottate nei rispettivi laboratori.

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Policlinico San Martino, l'identificazione degli isolati è stata effettuata mediante spettrometria di massa **MALDI-TOF MS** (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), metodica basata sull'analisi del profilo proteico batterico. La determinazione della sensibilità agli antimicrobici è stata eseguita mediante il sistema automatizzato **VITEK® 2** (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Salus – Alliance Medical, sia l'identificazione microbiologica sia la determinazione della sensibilità agli antimicrobici sono state effettuate mediante il sistema automatizzato **VITEK® 2** (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

In entrambi i laboratori, l'interpretazione dei risultati dell'antibiogramma è stata effettuata secondo i criteri stabiliti dall'**European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)** vigenti nel periodo di studio.

Per ciascun isolato sono stati registrati i risultati relativi ai principali antibiotici impiegati nel trattamento delle infezioni delle vie urinarie. Tali dati sono stati successivamente utilizzati per le analisi epidemiologiche e microbiologiche descritte nel capitolo dei Risultati.

11.7 Caratterizzazione molecolare dei ceppi non fermentanti il lattosio (Lac⁻)

Al fine di approfondire le caratteristiche genetiche dei ceppi di *Escherichia coli* non fermentanti il lattosio (Lac⁻), sono stati selezionati cinque isolati urinari da sottoporre a caratterizzazione molecolare mediante Whole Genome Sequencing (WGS).

La selezione dei ceppi è stata effettuata in modo mirato, sulla base del fenotipo di fermentazione del lattosio, del profilo di antibiotico-resistenza e della loro provenienza comunità o diversi reparti ospedalieri. La tabella 11.1 sottostante riporta le caratteristiche dei cinque ceppi selezionati

Codice ceppo	Data isolamento	Provenienza	antibiotipo
F228	23/03/2026	ASSOCIAZIONE GIGI GHIROTTI HSM	AcCipSX
F246	09/02/2026	CL UROL DEG MON P/8 PON HSM	AcCAzCipSX
F139	19/02/2026	CL.REUM-DH PAD.OCUL P/1 HSM	AcCip
F112	24/02/2026	SALUS	AcCAZCipGSX
F212	05/03/2026	SALUS	AcCipG

Tabella 11.1: Caratteristiche dei cinque ceppi selezionati per il WGS. Ac: Amoxicillina/clavulanato, Cip: ciprofloxacina, SX: trimetoprim/sulfametossazolo, G: gentamicina

11.8 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati organizzati in un database mediante **Microsoft Excel** (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e successivamente sottoposti ad analisi statistica descrittiva.

Per le variabili qualitative sono state calcolate le frequenze assolute e relative (percentuali), mentre per le variabili quantitative sono stati determinati i principali indici di tendenza centrale e di dispersione, comprendenti media, mediana e range di età.

L'analisi ha riguardato la distribuzione degli isolati di *Escherichia coli* nei due contesti assistenziali, con particolare riferimento al fenotipo di fermentazione del lattosio (Lac+/Lac-), al sesso, all'età dei pazienti e alla provenienza dei campioni.

Per i ceppi non fermentanti il lattosio (Lac-) è stata inoltre effettuata un'analisi comparativa dei profili di sensibilità agli antimicrobici tra gli isolati provenienti dal Policlinico San Martino e quelli dell'Istituto Salus – Alliance Medical. Le differenze tra le proporzioni sono state valutate mediante **test esatto di Fisher**, considerando statisticamente significativi i valori di **p < 0,05**.

12. Risultati

Nel presente capitolo sono riportati i risultati dell'analisi descrittiva degli isolati urinari di *Escherichia coli* inclusi nello studio. I dati sono stati organizzati in base al centro di provenienza e all'anno di isolamento, distinguendo gli isolati provenienti dall'Ospedale Policlinico San Martino e dall'Istituto Salus – Alliance Medical.

L'analisi ha preso in considerazione le caratteristiche demografiche della popolazione, la distribuzione dei ceppi fermentanti e non fermentanti il lattosio (fenotipo Lac+ e Lac-), la presenza di ceppi ESBL o con fenotipo compatibile con ESBL e i principali profili di sensibilità agli antimicrobici.

12.1 Caratteristiche generali della popolazione

L'arruolamento dei ceppi è stato condotto secondo modalità differenti in funzione dell'anno di riferimento e del contesto sanitario analizzato. Presso il Policlinico San Martino per il periodo gennaio–maggio 2026 è stato applicato un protocollo di raccolta prospettico e sistematico, che ha permesso l'analisi della totalità degli isolati di *Escherichia coli* uropatogeno processati nel medesimo periodo (n = 466), garantendo una caratterizzazione epidemiologica più completa della popolazione studiata (Tab. 12.1) (Fig.12.1).

Per quanto riguarda l'Istituto Salus – Alliance Medical, sono stati inclusi 390 isolati urinari di *Escherichia coli* relativi all'anno 2025 e 154 isolati relativi al periodo gennaio–maggio 2026, ottenuti mediante consultazione del database microbiologico della struttura e successiva estrazione dei dati clinico-microbiologici di interesse.

Nel campione Salus 2025 è stata osservata una netta prevalenza del sesso femminile, con 304 donne (77,9%) e 86 uomini (22,1%). L'età media dei pazienti era pari a 65,3 anni, con una mediana di 71,0 anni e un range compreso tra 1 e 97 anni.

Una distribuzione analoga è stata osservata nel Salus 2026, dove le donne rappresentavano il 76,0% della popolazione studiata (117 pazienti), mentre gli uomini costituivano il restante 24,0% (37 pazienti). In questo gruppo l'età media era di 68,6 anni, con una mediana di 74,0 anni e un range compreso tra 3 e 102 anni.

Anche nel dataset San Martino 2026 la popolazione era prevalentemente costituita da pazienti di sesso femminile (303; 64,7%), rispetto ai 163 uomini (35,0%) (Fig. 12.2). L'età media risultava pari a 68,7 anni, con una mediana di 74,0 anni e un range di 3–102 anni.

Nel complesso, la popolazione studiata ha mostrato una prevalenza del sesso femminile in tutti i gruppi, l'età media è risultata costantemente superiore ai 65 anni, indicando una prevalente distribuzione delle infezioni urinarie da *Escherichia coli* nella popolazione anziana.

Dataset	Isolati (n)	Femmine	Maschi	Età media	Mediana	Range
Salus 2025	390	304 (77,9%)	86 (22,1%)	65,3	71,0	1–97
San Martino 2026	466	303 (65,0%)	163 (35,0%)	68,6	74,0	3–102
Salus 2026	154	117 (76,0%)	37 (24,0%)	67,2	72,5	6–97

Tabella 12.1. Caratteristiche generali della popolazione studiata.

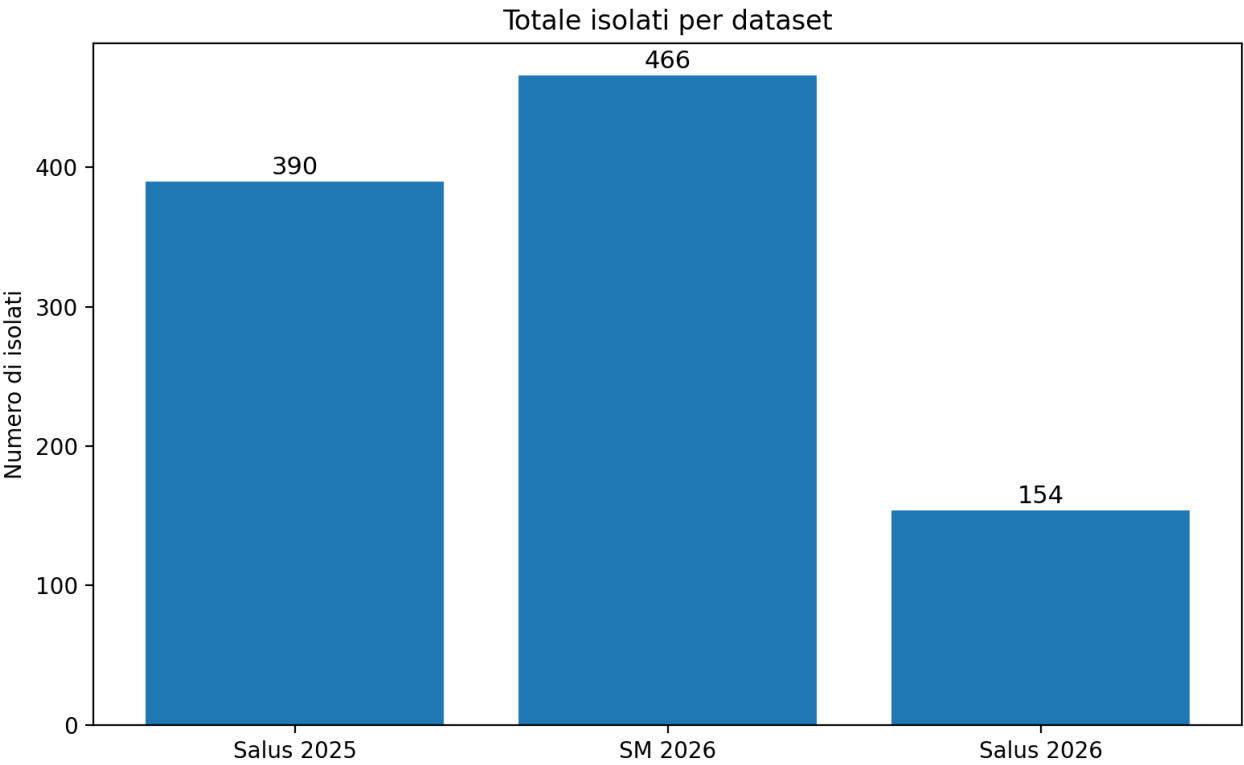


Figura 12.1. Totale degli isolati inclusi nei diversi dataset.

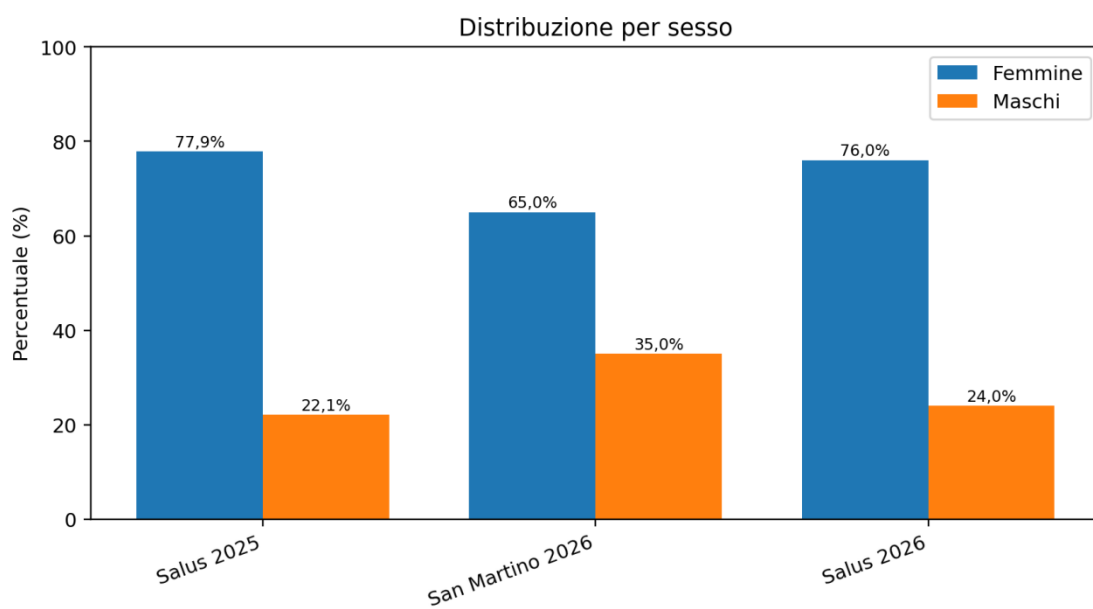


Figura 12.2. Distribuzione percentuale dei pazienti per sesso nei dataset con dato disponibile.

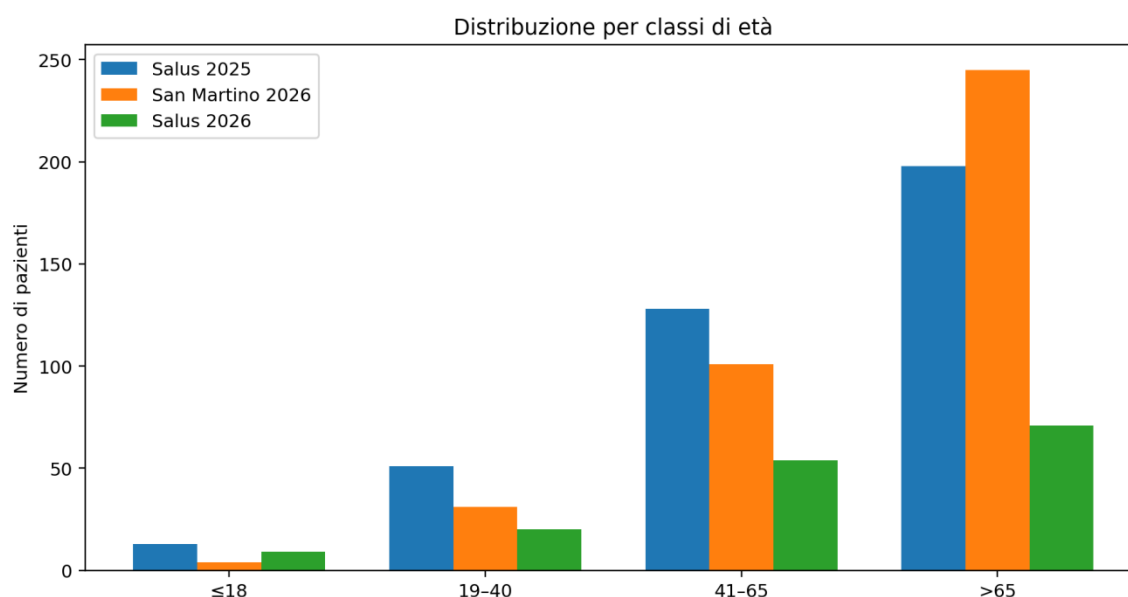


Figura 12.3. Distribuzione per classi di età nei dataset con dato anagrafico disponibile

12.2 Provenienza degli isolati

La provenienza dei campioni urinari è stata analizzata per valutare la distribuzione degli isolati di *Escherichia coli* nei diversi contesti assistenziali inclusi nello studio (Tab.12.2).

Per il Policlinico San Martino per l'anno 2026 era disponibile anche la provenienza del paziente. Dei 466 isolati analizzati, 237 (50,9%) provenivano da pazienti ricoverati nei reparti di degenza, 105 (22,5%) da pazienti afferenti al Pronto Soccorso e 124 (26,6%) da pazienti esterni. La quota maggiore di isolati risultava quindi associata ai pazienti ricoverati.

Per quanto riguarda l'Istituto Salus – Alliance Medical, tutti gli isolati provenivano da un contesto territoriale e ambulatoriale, rappresentativo delle infezioni urinarie acquisite in comunità.

Provenienza	Totale	% sul totale	Femmine	Maschi	Età media	Mediana	Range
URMI Interni	237	50,9%	149	88	70,1	74,0	3–102
URMI Interni PS	105	22,5%	60	45	68,3	76,0	17–97
URMI Esterni	124	26,6%	94	30	66,1	70,0	3–94

Tabella 12.2. Isolati del San Martino 2026 per provenienza.

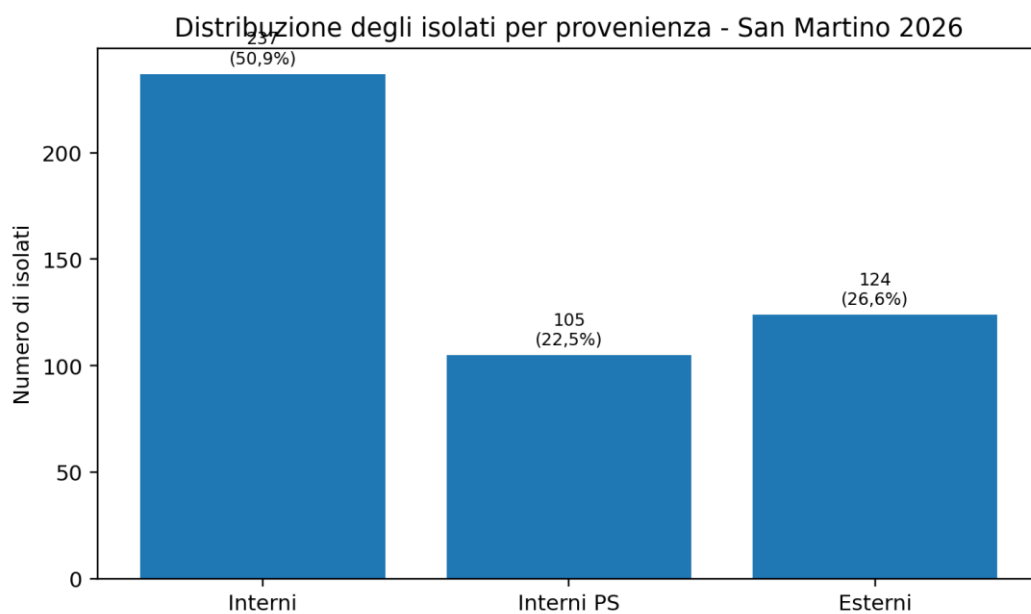


Figura 12.4. Distribuzione degli isolati del San Martino 2026 in base alla provenienza del paziente.

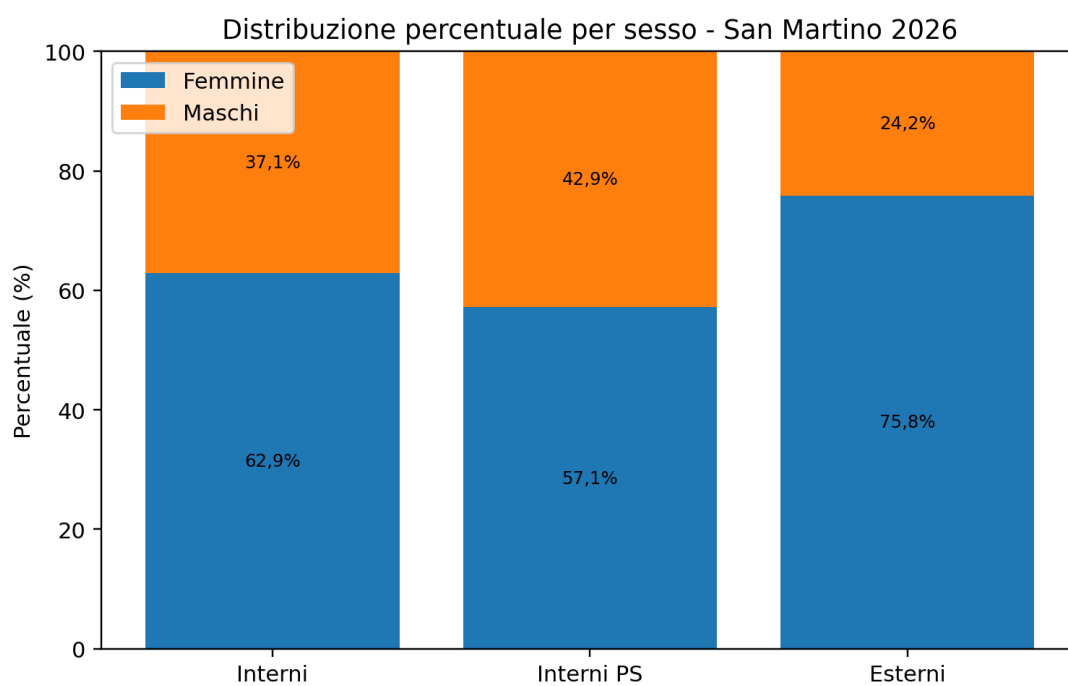


Figura 12.5. Distribuzione percentuale per sesso in base alla provenienza del paziente.

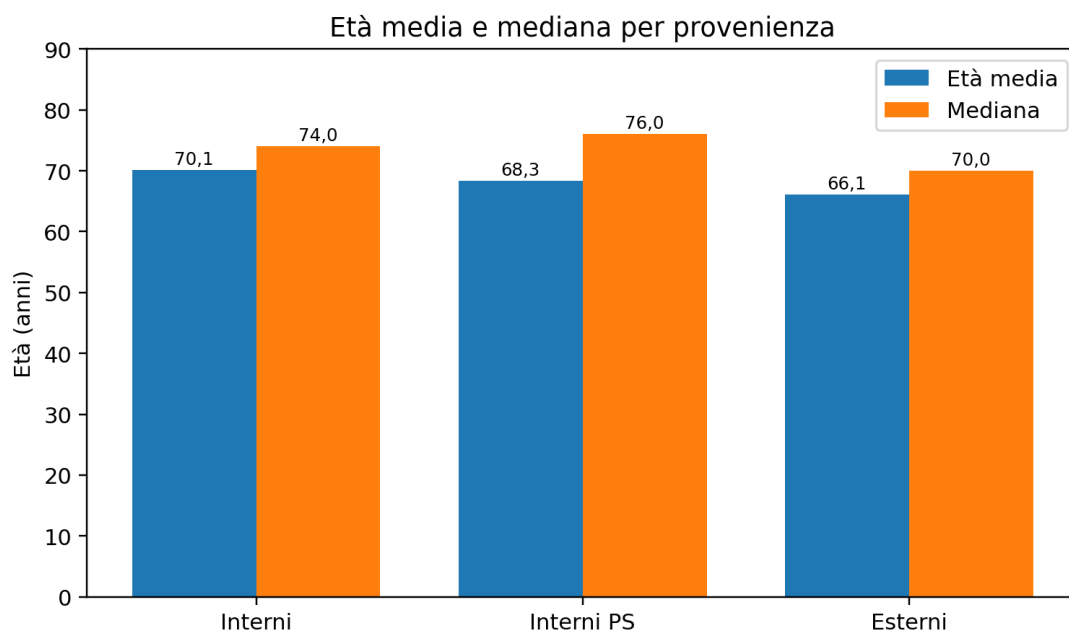


Figura 12.6. Età media e mediana per provenienza del paziente.

12.3 Distribuzione dei ceppi Lac+ e Lac–

Per i ceppi isolati al San Martino nel 2026 i ceppi Lac– erano 66 su 466 (14,2%), mentre nel Salus 2026 sono stati osservati 15 ceppi Lac– su 154 isolati (9,7%) (Tab. 12.3).

Il confronto tra i due contesti assistenziali nel periodo gennaio–maggio 2026 ha evidenziato una maggiore frequenza di ceppi Lac– nel Policlinico San Martino rispetto all'Istituto Salus – Alliance Medical (14,2% vs 9,7%). Tuttavia, tale differenza non è risultata statisticamente significativa (test esatto di Fisher, $p = 0.170$), suggerendo che la diversa distribuzione osservata possa essere attribuibile alla variabilità campionaria piuttosto che a una reale differenza tra i due setting assistenziali.

Dataset	Totale	Lac+	Lac–	% Lac–
San Martino 2026	466	400	66	14,2%
Salus 2026	154	139	15	9,7%

Tabella 12.3. Distribuzione dei ceppi Lac+ e Lac– nei gruppi con dato disponibile.

Dataset	Gruppo	n	Femmine	Età media	Mediana	Range
San Martino 2026	Lac+	400	265 (66,2%)	68,6	73,0	3–102
San Martino 2026	Lac–	66	38 (57,6%)	68,6	75,5	24–90
Salus 2026	Lac+	139	108 (77,7%)	68,1	73,0	6–97
Salus 2026	Lac–	15	9 (60,0%)	58,3	69,0	24–89

Tabella 12.4. Caratteristiche dei ceppi Lac+ e Lac– nei dataset 2026.

12.4 Confronto del profilo di sensibilità tra i ceppi LAC+ e LAC– del Policlinico San Martino

Per valutare l'eventuale associazione tra il fenotipo di fermentazione del lattosio e il profilo di antibiotico-resistenza, è stato confrontato il comportamento dei ceppi di *Escherichia coli* fermentanti il lattosio (LAC+) e non fermentanti il lattosio (LAC–) isolati presso il Policlinico San Martino.

Si precisa che il numero di isolati valutati per ciascun antibiotico non è risultato uniforme, poiché il pannello degli antimicrobici refertati variava in funzione delle procedure routinarie del laboratorio e del pannello di sensibilità utilizzato dal sistema automatico. Pertanto, le percentuali di resistenza sono state calcolate considerando esclusivamente gli isolati effettivamente testati per ciascun antibiotico.

Il confronto ha evidenziato un profilo di antibiotico-resistenza complessivamente più sfavorevole nei ceppi LAC– rispetto ai ceppi LAC+. In particolare, la resistenza ad amoxicillina/acido clavulanico è risultata sensibilmente più elevata nei ceppi LAC– (60,6%) rispetto ai ceppi LAC+ (38,2%). Analogamente, è stato osservato un incremento della resistenza nei confronti dei fluorochinoloni, con percentuali maggiori per ciprofloxacina e levofloxacina nei ceppi LAC– rispetto ai ceppi fermentanti il lattosio.

Anche il profilo di sensibilità alle cefalosporine di terza generazione ha mostrato differenze tra i due gruppi. La resistenza al ceftazidime e cefotaxime è risultata più elevata nei ceppi LAC– rispetto ai LAC+.

Gentamicina e nitrofurantoina hanno mantenuto una buona attività in entrambi i gruppi, mentre meropenem è risultato attivo nei confronti della quasi totalità degli isolati, senza differenze rilevanti tra ceppi LAC+ e LAC–.

Nel complesso, i risultati indicano che i ceppi non fermentanti il lattosio isolati presso il Policlinico San Martino presentano un profilo di antibiotico-resistenza più marcato rispetto ai ceppi fermentanti, in particolare nei confronti di amoxicillina/acido clavulanico, fluorochinoloni e cefalosporine di terza generazione.

12.5 Confronto del profilo di sensibilità tra i ceppi LAC+ e LAC– dell'Istituto Salus

Analogamente a quanto osservato per il Policlinico San Martino, è stato confrontato il profilo di sensibilità dei ceppi LAC+ e LAC– isolati presso l'Istituto Salus – Alliance Medical (Tab. 12.5).

Anche in questo contesto i ceppi LAC– hanno mostrato un profilo di antibiotico-resistenza complessivamente più sfavorevole rispetto ai ceppi LAC+. La resistenza ad amoxicillina/acido clavulanico è risultata pari al 60,0% nei ceppi LAC–, contro il 38,8% dei ceppi LAC+, mentre le differenze più marcate sono state osservate nei confronti dei fluorochinoloni. In particolare, la resistenza a ciprofloxacina e levofloxacina ha raggiunto il 73,3% nei ceppi LAC–, evidenziando un incremento sostanziale rispetto ai ceppi fermentanti il lattosio.

Per quanto riguarda le cefalosporine di terza generazione, la resistenza è risultata complessivamente contenuta in entrambi i gruppi, sebbene le conclusioni relative ai ceppi LAC– debbano essere interpretate con cautela a causa del limitato numero di isolati disponibili.

Meropenem ha mantenuto una completa attività nei confronti di tutti gli isolati esaminati, mentre la resistenza a gentamicina e trimetoprim/sulfametossazolo è risultata moderata.

Nel complesso, anche i dati dell'Istituto Salus confermano che il fenotipo non fermentante il lattosio è associato a un profilo di antibiotico-resistenza più sfavorevole rispetto ai ceppi LAC+, con particolare riferimento ad amoxicillina/acido clavulanico e ai fluorochinoloni.

Profilo di sensibilità dei ceppi LAC+ e LAC– del Policlinico San Martino

Antibiotico	LAC+ n/N testati (%)	LAC– n/N testati (%)	p-value (Fisher)
Amoxicillina/Ac. clavulanico (AMC)	142/372 (38,2%)	40/66 (60,6%)	0,001
Cefotaxime (CTX)	11/44 (25,0%)	5/11 (45,5%)	0,199
Ceftazidime (CAZ)	59/399 (14,8%)	18/66 (27,3%)	0,010
Ciprofloxacina (CIP)	82/372 (22,0%)	30/66 (45,5%)	<0,001
Gentamicina (GEN)	33/388 (8,5%)	15/66 (22,7%)	0,002
Levofloxacina (LVX)	79/399 (19,8%)	23/66 (34,8%)	0,005
Meropenem (MEM)	3/372 (0,8%)	0/66 (0,0%)	1,000
Trimetoprim/Sulfametossazolo (SXT)	115/399 (28,8%)	18/66 (27,3%)	0,825
Nitrofurantoina (NIT)	5/393 (1,3%)	2/66 (3,0%)	0,299

Dati espressi come numero di ceppi resistenti (R) sul numero di ceppi testati per ciascun antibiotico (%).
In **grassetto**: differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Profilo di sensibilità dei ceppi LAC+ e LAC– dell'Istituto Salus – Alliance Medical

Antibiotico	LAC+ n/N testati (%)	LAC– n/N testati (%)	p-value (Fisher)
Amoxicillina/Ac. clavulanico (AMC)	54/139 (38,8%)	9/15 (60,0%)	0,168
Cefotaxime (CTX)	29/139 (20,9%)	1/15 (6,7%)	0,223
Ceftazidime (CAZ)	29/139 (20,9%)	1/15 (6,7%)	0,223
Ciprofloxacina (CIP)	43/139 (30,9%)	11/15 (73,3%)	0,006
Gentamicina (GEN)	12/139 (8,6%)	3/15 (20,0%)	0,184
Levofloxacina (LVX)	37/139 (26,6%)	11/15 (73,3%)	0,001
Meropenem (MEM)	0/139 (0,0%)	0/15 (0,0%)	1,000
Trimetoprim/Sulfametossazolo (SXT)	41/139 (29,5%)	6/15 (40,0%)	0,435
Nitrofurantoina (NIT)	ND	ND	–

Dati espressi come numero di ceppi resistenti (R) sul numero di ceppi testati per ciascun antibiotico (%).
ND: non disponibile (dato non inserito nel pannello di sensibilità del sistema).
In **grassetto**: differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Tabella 12.5: Confronto del profilo di sensibilità tra i due contesti assistenziali

12.6 Confronto del profilo di sensibilità tra il Policlinico San Martino e l'Istituto Salus

Dopo aver confrontato separatamente il profilo di sensibilità dei ceppi LAC+ e LAC- nei due contesti assistenziali, è stato effettuato un confronto diretto tra il Policlinico San Martino e l'Istituto Salus – Alliance Medical, al fine di valutare eventuali differenze nella distribuzione delle resistenze agli antimicrobici.

Per i ceppi LAC+, il profilo di sensibilità è risultato complessivamente sovrapponibile nei due laboratori. Le percentuali di resistenza ad amoxicillina/acido clavulanico e a trimetoprim/sulfametossazolo sono risultate molto simili, mentre i fluorochinoloni hanno mostrato valori lievemente superiori nei ceppi dell'Istituto Salus. Nei confronti delle cefalosporine di terza generazione non sono emerse differenze di particolare rilievo, mentre gentamicina e meropenem hanno mantenuto un'elevata attività in entrambi i contesti (Tab.12.6).

Il confronto dei ceppi LAC- ha evidenziato alcune differenze più marcate. In entrambi i centri è stata osservata un'elevata resistenza ad amoxicillina/acido clavulanico (circa il 60%), mentre i ceppi dell'Istituto Salus hanno mostrato percentuali di resistenza più elevate nei confronti di ciprofloxacina e levofloxacina. Al contrario, i ceppi del Policlinico San Martino hanno presentato una maggiore frequenza di resistenza alle cefalosporine di terza generazione, in particolare alla ceftazidime. Meropenem è risultato attivo nei confronti di tutti i ceppi LAC- analizzati in entrambi i laboratori (Tab.12.7).

Per valutare la significatività statistica delle differenze osservate è stato applicato il test esatto di Fisher, particolarmente indicato per il confronto tra gruppi caratterizzati da una ridotta numerosità campionaria, come nel caso dei ceppi LAC- dell'Istituto Salus. I risultati ottenuti hanno consentito di identificare gli antibiotici per i quali le differenze di resistenza tra i due contesti assistenziali risultavano statisticamente significative.

Nel complesso, il confronto tra il Policlinico San Martino e l'Istituto Salus conferma che il fenotipo non fermentante il lattosio è associato a un profilo di antibiotico-resistenza complessivamente più sfavorevole rispetto ai ceppi LAC+ in entrambi i contesti assistenziali. Le principali differenze riguardano la maggiore resistenza ai fluorochinoloni nei ceppi LAC- dell'Istituto Salus e la maggiore frequenza di resistenza alle cefalosporine di terza generazione nei ceppi LAC- del Policlinico San Martino. Tuttavia, tali risultati devono essere interpretati con cautela, considerando il limitato numero di ceppi LAC- isolati presso l'Istituto Salus.

Profilo di resistenza dei ceppi LAC+

Antibiotico	San Martino	Salus
AMC	142/372 (38.2%)	54/139 (38.8%)
CTX	11/44 (25.0%)	29/139 (20.9%)
CAZ	59/399 (14.8%)	29/139 (20.9%)
CIP	82/372 (22.0%)	43/139 (30.9%)
GEN	33/388 (8.5%)	12/139 (8.6%)
LVX	79/399 (19.8%)	37/139 (26.6%)
MEM	3/372 (0.8%)	0/139 (0.0%)
SXT	115/399 (28.8%)	41/139 (29.5%)
NIT	5/393 (1.3%)	ND

Tabella 12.6: Confronto del profilo di resistenza dei ceppi di *Escherichia coli* fermentante il lattosio tra San Martino e Salus

Profilo di resistenza dei ceppi LAC-

Antibiotico	San Martino	Salus
AMC	40/66 (60.6%)	9/15 (60.0%)
CTX	5/11 (45.5%)	1/15 (6.7%)
CAZ	18/66 (27.3%)	1/15 (6.7%)
CIP	30/66 (45.5%)	11/15 (73.3%)
GEN	15/66 (22.7%)	3/15 (20.0%)
LVX	23/66 (34.8%)	11/15 (73.3%)
MEM	0/66 (0.0%)	0/15 (0.0%)
SXT	18/66 (27.3%)	6/15 (40.0%)
NIT	2/66 (3.0%)	ND

Tabella 12.7: Confronto del profilo di resistenza dei ceppi di *Escherichia coli* fermentante il lattosio tra San Martino e Salus

12.7 Distribuzione dei ceppi ESBL nei due contesti assistenziali

La distribuzione dei ceppi produttori di β -lattamasi a spettro esteso (*Extended-Spectrum β -Lactamases*, ESBL) è stata valutata esclusivamente sulla base dei dati disponibili presso i due laboratori di microbiologia.

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Policlinico San Martino, l'identificazione dei ceppi ESBL è stata effettuata secondo le procedure diagnostiche routinarie del laboratorio e il relativo risultato era riportato direttamente nel database microbiologico. Nel periodo compreso tra gennaio e maggio 2026 sono stati identificati **22 ceppi ESBL** su **466** isolati urinari di *Escherichia coli*, corrispondenti a una prevalenza del **4,7%** (Tab 12.8).

Diversamente, presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Salus – Alliance Medical il database non riportava una classificazione specifica dei ceppi ESBL. Per tale motivo è stata effettuata una valutazione fenotipica retrospettiva degli isolati sulla base del profilo di sensibilità agli antibiotici β -lattamici. Sono stati considerati fenotipicamente compatibili con la produzione di ESBL gli isolati che presentavano resistenza ad almeno una cefalosporina di terza o quarta generazione (cefotaxime, ceftazidime o cefepime), secondo i criteri interpretativi EUCAST. Applicando questo criterio sono stati identificati 72 ceppi (18,5%) tra i 390 isolati del Salus 2025 e 32 ceppi (20,8%) tra i 154 isolati del Salus 2026.

È opportuno sottolineare che i dati ottenuti nei due laboratori non sono direttamente confrontabili, poiché derivano da metodologie differenti. Presso il Policlinico San Martino i ceppi ESBL sono stati microbiologicamente confermati secondo le procedure diagnostiche adottate nella pratica routinaria, mentre presso l'Istituto Salus – Alliance Medical sono stati identificati isolati con fenotipo compatibile con ESBL sulla base del solo profilo di sensibilità agli antibiotici, senza una conferma microbiologica specifica della produzione di β -lattamasi a spettro esteso.

Questa differenza metodologica rappresenta un limite del confronto tra i due contesti assistenziali e deve essere tenuta in considerazione nell'interpretazione dei risultati. Tuttavia, la presenza, in entrambi i laboratori, di isolati ESBL confermati o con fenotipo compatibile con ESBL evidenzia la diffusione di ceppi di *Escherichia coli* caratterizzati da ridotta sensibilità alle cefalosporine di terza e quarta generazione, sottolineando l'importanza della sorveglianza microbiologica e dell'impiego appropriato degli antibiotici nella gestione delle infezioni delle vie urinarie.

Laboratorio	Periodo	Isolati (n)	Criterio	ESBL / compatibile (n)	%
Policlinico San Martino	Gen–Mag 2026	466	ESBL riportato dal laboratorio	22	4,7%
Salus – Alliance Medical	2025	390	Fenotipo compatibile con ESBL	72	18,5%
Salus – Alliance Medical	Gen–Mag 2026	154	Fenotipo compatibile con ESBL	32	20,8%

Tabella 12.8. Distribuzione dei ceppi ESBL/fenotipo compatibile con ESBL

12.8 Analisi degli isolati del Policlinico San Martino in base alla provenienza dei pazienti

Al fine di approfondire le caratteristiche epidemiologiche dei ceppi isolati presso il Policlinico San Martino, è stata successivamente valutata la distribuzione dei ceppi Lac⁻, dei ceppi ESBL e dei relativi profili di antibiotico-resistenza nei differenti contesti assistenziali (ricovero ordinario, Pronto Soccorso ed esterni).

12.8.1 Distribuzione dei ceppi Lac⁻ per provenienza

La distribuzione dei ceppi non fermentanti il lattosio ha evidenziato una frequenza più elevata nei pazienti ricoverati (38/237; 16,0%) rispetto ai pazienti provenienti dal Pronto Soccorso (12/105; 11,4%) e agli esterni (16/124; 12,9%) (Tab. 12.9.) (Fig.12.7.) (Fig. 12.8.)

Provenienza	Totale	Lac ⁺	Lac ⁻	% Lac ⁻	ESBL n (%)
URMI Interni	237	199	38	16,0%	15 (6,3%)
URMI Interni PS	105	93	12	11,4%	3 (2,9%)
URMI Esterni	124	108	16	12,9%	4 (3,2%)

Tabella 12.9. Distribuzione dei ceppi Lac⁻ ed ESBL per provenienza nel San Martino 2026.

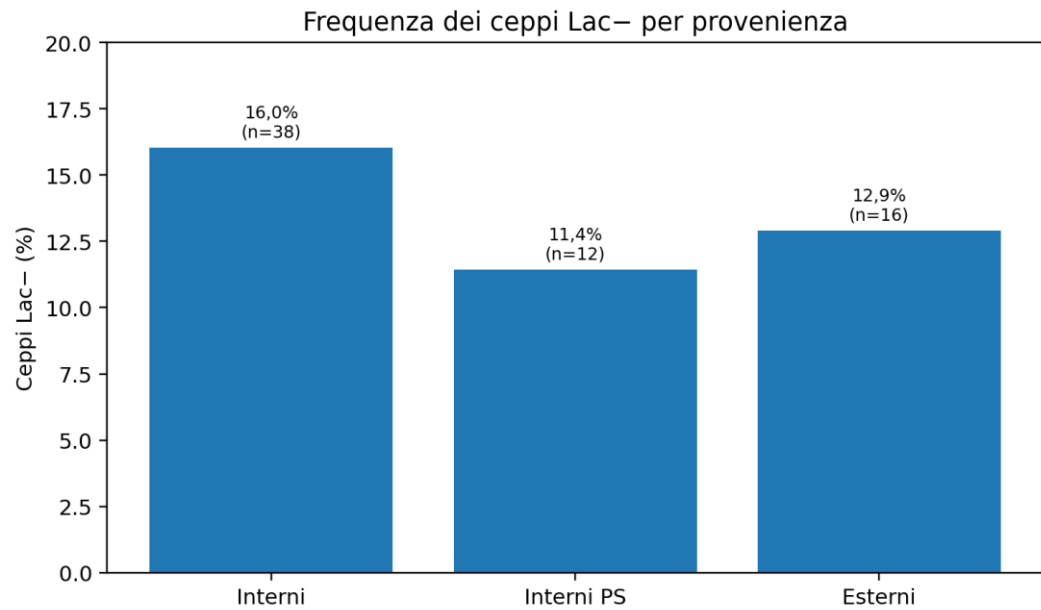


Figura 12.7. Frequenza dei ceppi Lac⁻ per provenienza.

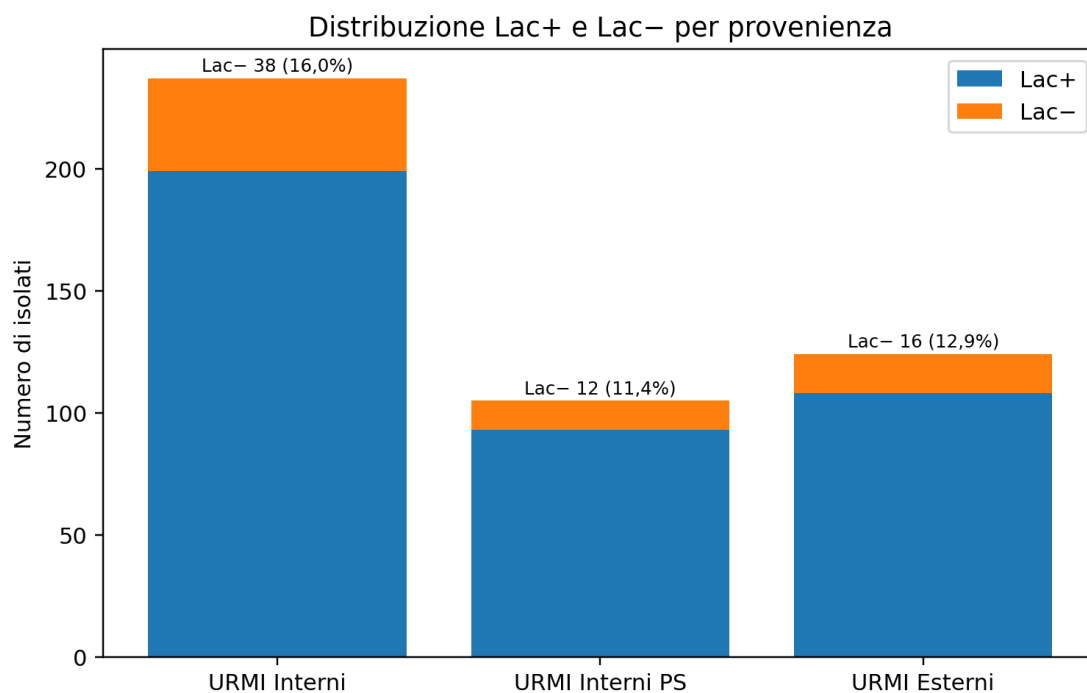


Figura 12.8. Distribuzione Lac+ e Lac- per provenienza.

12.8.2 Distribuzione dei ceppi ESBL per provenienza

I ceppi ESBL sono risultati maggiormente rappresentati tra i pazienti ricoverati (15/237; 6,3%) rispetto ai pazienti provenienti dal Pronto Soccorso (3/105; 2,9%) e agli esterni (4/124; 3,2%) (Fig. 12.9). Tale dato è coerente con una maggiore pressione selettiva in ambito ospedaliero, ma deve essere interpretato come osservazione descrittiva.

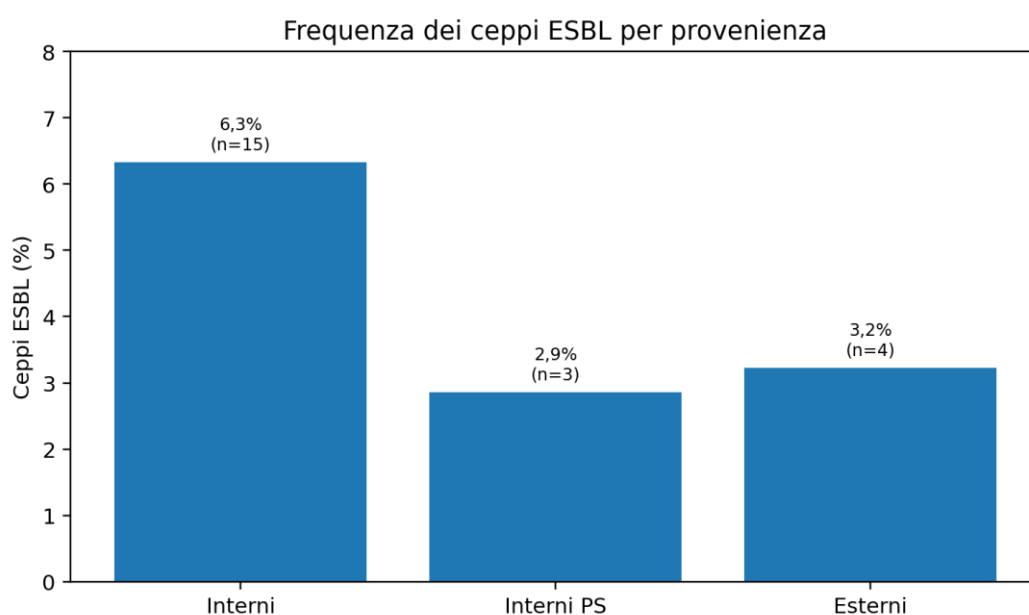


Figura 12.9. Frequenza di ceppi ESBL in base alla provenienza Interni, Interni PS, Esterni.

12.8.3 Profili di antibiotico-resistenza per provenienza nei ceppi Lac⁻

L'analisi dei profili di resistenza nei ceppi Lac⁻ del San Martino ha mostrato percentuali generalmente più elevate nei pazienti ricoverati e in quelli provenienti dal Pronto Soccorso rispetto agli esterni, in particolare per alcuni β -lattamici e fluorochinoloni. I ceppi esterni hanno mostrato, nel complesso, un profilo di sensibilità più favorevole (Tab.12.10).

Antibiotico	Interni	Interni PS	Esterni
AMC	23/38 (60,5%)	9/12 (75,0%)	8/16 (50,0%)
CAZ	14/38 (36,8%)	3/12 (25,0%)	1/16 (6,2%)
CIP	18/38 (47,4%)	7/12 (58,3%)	5/16 (31,2%)
GEN	10/38 (26,3%)	3/12 (25,0%)	2/16 (12,5%)
LVX	12/37 (32,4%)	7/12 (58,3%)	4/16 (25,0%)
MEM	0/38 (0,0%)	0/12 (0,0%)	0/16 (0,0%)
SXT	11/37 (29,7%)	4/12 (33,3%)	3/16 (18,8%)

Tabella 12.10. Resistenza ai principali antibiotici nei ceppi Lac⁻ per provenienza.

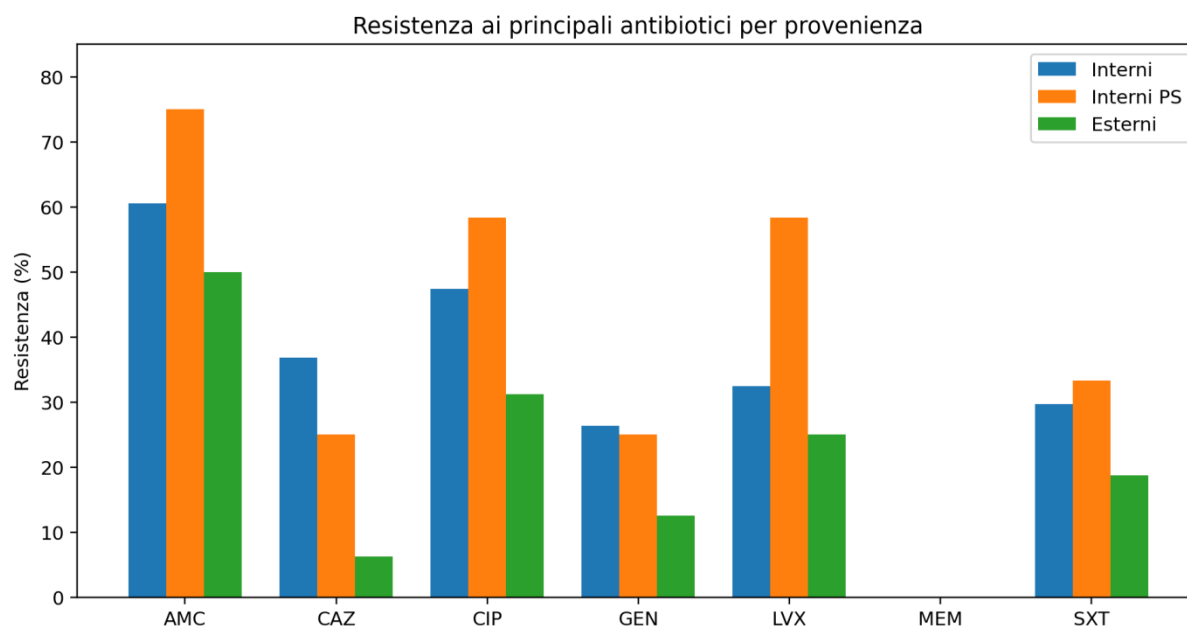


Figura 12.10. Resistenza ai principali antibiotici per provenienza nei ceppi Lac⁻.

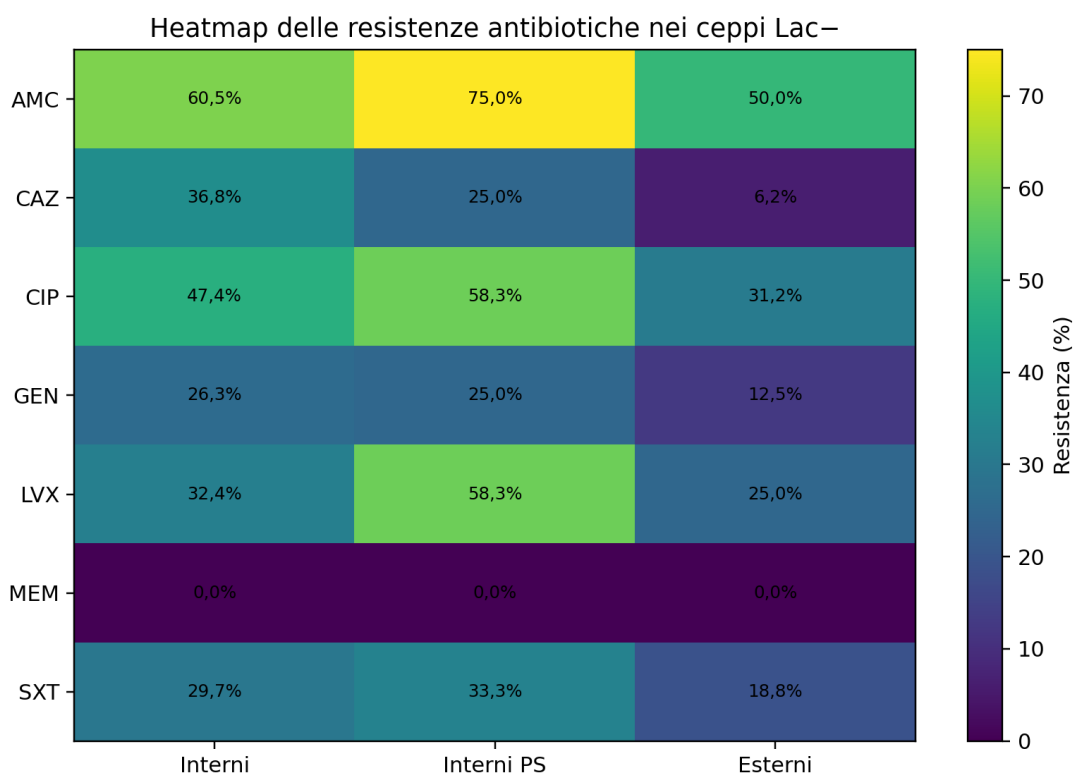


Figura 12.11. Heatmap delle resistenze antibiotiche nei ceppi Lac⁻ per provenienza.

12.9 Sintesi delle analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte con finalità descrittiva ed esplorativa. Per i confronti tra proporzioni è stato utilizzato il test esatto di Fisher, considerando statisticamente significativi valori di $p < 0,05$ (Tab. 12.11).

Nel complesso, le analisi hanno evidenziato una proporzione maggiore di ceppi Lac⁻ nel Policlinico San Martino rispetto all'Istituto Salus – Alliance Medical; tuttavia, tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p = 0,170$). Il confronto dei profili di antibiotico-resistenza dei ceppi Lac⁻ ha mostrato una differenza statisticamente significativa esclusivamente per la levofloxacina ($p = 0,010$), mentre per gli altri antibiotici analizzati non sono emerse differenze statisticamente significative.

Nel complesso, i risultati indicano che, pur in presenza di alcune differenze nei profili di antibiotico-resistenza, non sono emerse differenze statisticamente significative nella distribuzione dei ceppi Lac⁻ tra i due contesti assistenziali, ad eccezione della resistenza alla levofloxacina.

Confronto	Test	p-value	Interpretazione
Distribuzione Lac ⁻ San Martino 2026 vs Salus 2026	Test esatto di Fisher	p = 0,170	Non significativa
Resistenza a ciprofloxacina nei Lac ⁻	Test esatto di Fisher	p = 0,084	Non significativa
Resistenza a levofloxacina nei Lac ⁻	Test esatto di Fisher	p = 0,010	Significativa
Resistenza a trimetoprim/sulfametossazolo nei Lac ⁻	Test esatto di Fisher	p = 0,363	Non significativa

Tabella 12.11. Sintesi delle principali analisi statistiche aggiornate

12.10 Analisi genomica WGS di ceppi con fenotipo Lac- selezionati

L'analisi mediante WGS ha evidenziato che quattro ceppi dei cinque studiati (4/5) appartenevano al complesso ST 14 cplx e al Sequence Type (ST) 1193. Il quinto isolato apparteneva al complesso ST69 cplx e al ST69. I quattro ceppi ST 1193 provenivano sia da pazienti comunitari isolati presso l'Istituto Salus, sia da pazienti ospedalizzati presso il policlinico San Martino, sia da pazienti comunitari afferenti all'Associazione Gigi Ghirotti (Tab. 12.13)

Dei quattro ceppi appartenenti al ST1193, due avevano formula antigenica O75:H5 e i due rimanenti sierotipo O18:H5. L'isolato appartenente al ST69 è stato assegnato al sierotipo H18 per quanto riguarda l'antigene flagellare, e al gruppo 9 O-AGC (O-antigen biosynthesis gene clusters) che include diversi sierotipi O tutti con elevata similitudine (O17/O44/O73/O77/O106).

L'analisi dei geni e di mutazioni correlate alla resistenza ha confermato gli antibiotipi (Tabella 12.13). In particolare, tutti i ceppi presentavano le mutazioni parC_S80I; gyrA_S83L nei geni per la girasi e la topoisomerasi IV, mutazioni correlate alla resistenza ai fluorochinoloni. Inoltre, i quattro ceppi appartenenti al Sequence Type ST 1193 erano caratterizzati anche dalle mutazioni gyrA_D87N e parE_L416F.

Nei ceppi resistenti ai sulfamidici è stato rilevato il gene dfrA17 che codifica per una diidrofolato reductasi acquisita resistente al trimetoprim e i geni Sul1 e Sul2 che codificano per delle diidropteroato sintasi alternative, poco sensibili ai sulfamidici.

I quattro ceppi appartenenti al Sequence Type ST 1193 erano tutti caratterizzati anche dalla presenza della mutazione E350Q nel gene uhpT che codifica il trasportatore di membrana UhpT; tuttavia, questa mutazione da sola può non essere associata alla resistenza alla fosfomicina, resistenza, infatti, assente nei nostri isolati.

Per la resistenza alla gentamicina sono stati rilevati i geni per le acetiltransferasi aac (3) -IIe; aac (6') -Ib-cr5 e aac (3) -IId.

Sono stati rilevati anche alcuni geni per fosfotransferasi e adeniltrasferasi correlati alla resistenza alla streptomicina.

Per quanto riguarda i beta-lattamici i quattro ceppi appartenenti all'ST1193 tre presentavano il gene per la beta-lattamasi TEM-1, mentre il quarto era caratterizzato dalla presenza di tre geni per tre diverse beta-lattamasi: blaCTX-M-15; blaCMY-4 e blaOXA-1. In particolare, questo ceppo

presentava resistenza oltre che ad amoxicillina/clavulanato anche a ceftazidime, cefalosporina di terza generazione. Il gene *blaCTX-M-15* è stato rinvenuto anche in un ceppo appartenente al Sequence Type ST 1193 e resistente al ceftazidime.

L'unico ceppo non appartenente al Sequence Type ST 1193, ma al Sequence Type ST 69 presentava una mutazione nonsense nel gene *CirA*, gene che codifica per un recettore della membrana esterna coinvolto nel sistema di trasporto dei siderofori utilizzato anche dalla cefalosporina cefiderocol. Tale mutazione che dà luogo ad una proteina interrotta può essere correlata alla resistenza al cefiderocol. Per questo ceppo è stata valutata la sensibilità al cefiderocol mediante il test di disco diffusione e il fenotipo ha confermato la resistenza a questa molecola come possibile sulla base del genotipo rilevato.

L'analisi dei geni di virulenza dei cinque isolati sequenziati ha evidenziato alcuni elementi comuni e differenze associate al sequence type (Tabella 12.14).

Tutti gli isolati presentavano i geni *iucABCD* e *iutA* del sistema dell'aerobactina e numerosi geni del sistema della yersiniabactina, inclusi *fyuA*, *irp1* e diversi geni *ybt*. Tutti gli isolati possedevano inoltre il gene *fimH* per l'adesina terminale delle fimbrie di tipo 1.

I ceppi ST1193 erano caratterizzati dalla presenza del gene *usp*, codificante per la uropathogenic-specific protein. Questa citotossina, in esperimenti cellulari si è dimostrata in grado di provocare danni al DNA delle cellule dell'ospite, alterazioni del citoscheletro e attivazione di processi simili all'apoptosi [105]

Solo il ceppo appartenente al ST69 presentava *hlyE*, che codifica l'emolisina E.

Isolato	ST	Beta-lattamici	ciprofloxacina	trimetoprim/sulfametossazolo	gentamicina
F112	ST1193	<i>blaCMY-4</i> , <i>blaOXA-1</i> ; <i>blaCTX-M-15</i>	<i>gyrA_S83L</i> , <i>gyrA_D87N</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>parE_L416F</i> ; <i>aac(6')-Ib-cr5</i>	-	<i>aac(3)-Ile</i>
F139	ST1193	<i>blaTEM-1</i>	<i>gyrA_S83L</i> , <i>gyrA_D87N</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>parE_L416F</i>	-	-
F228	ST1193	<i>blaTEM-1</i>	<i>gyrA_S83L</i> , <i>gyrA_D87N</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>parE_L416F</i>	<i>dfrA17</i> + <i>sul2</i>	-
F212	ST1193	<i>blaTEM-1</i>	<i>gyrA_S83L</i> , <i>gyrA_D87N</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>parE_L416F</i>	-	<i>aac(3)-IId</i>
F246	ST69	<i>blaOXA-48</i> ; <i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaTEM-1</i> ; <i>cirA_W164Ter</i>	<i>gyrA_S83L</i> + <i>parC_S80I</i>	<i>dfrA17</i> + <i>sul1</i> + <i>sul2</i>	-

Tabella 12.13. Distribuzione dei principali geni di resistenza agli antibiotici

Sistema/fattore	Geni associati	F112 ST1193	F139 ST1193	F228 ST1193	F212 ST1193	F246 ST69
Aerobactina	<i>iucABCD, iutA</i>	+	+	+	+	+
Yersiniabactina	<i>ybtA, ybtE, ybtP, ybtQ, ybtS, ybtT, ybtU, irp1, fyuA</i>	+	+	+	+	+
Uropathogenic- specific protein	<i>usp</i>	+	+	+	+	–
Emolisina E	<i>hlyE</i>	–	–	–	–	+

Tabella 12.14: Tabella dei fattori di virulenza studiati

13. Discussione

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) sono tra le infezioni batteriche più frequenti a livello mondiale nella popolazione generale e comprendono cistiti, pielonefriti, prostatiti e infezioni associate a catetere ed *E. coli* uropatogeno è il principale agente eziologico sia in comunità che ospedale.

Si stima che milioni di persone sviluppino ogni anno almeno un episodio di infezione urinaria, con una maggiore prevalenza nel sesso femminile a causa di fattori anatomici e fisiologici che favoriscono la colonizzazione batterica del tratto urinario

Nelle donne l'incidenza aumenta dopo l'inizio dell'attività sessuale e nuovamente dopo la menopausa. Negli uomini le IVU sono meno frequenti in età giovanile, ma aumentano negli anziani, soprattutto in presenza di ipertrofia prostatica, ristagno urinario, cateterizzazione o procedure urologiche.

Dall'analisi dei nostri dati è emersa una prevalenza dei soggetti di sesso femminile in tutti i gruppi, confermando il dato epidemiologico mondiale. L'età media è risultata costantemente superiore ai 65 anni, indicando una prevalente distribuzione delle infezioni urinarie da *E. coli* nella popolazione anziana sia in ambito comunitario sia ospedaliero. Questo dato riflette la situazione epidemiologica della popolazione italiana, caratterizzata da un progressivo invecchiamento. In comunità è stata osservata una percentuale più alta di R ai FQ, questo fenomeno potrebbe essere ascritto ad un uso eccessivo di queste molecole associato alla selezione e diffusione di cloni particolarmente diffusivi come dimostrato dalla presenza tra gli isolati caratterizzati mediante WGS del clone pandemico ST1193. L'aumento dei ceppi lac-, legati alla circolazione del clone ST1193 può passare inosservata in molti laboratori, in quanto la disponibilità di terreni cromogeni per l'urinocoltura ha sostituito l'utilizzo del terreno McConkey. Alla luce di questi dati sembra utile reinserire il terreno McConkey per monitorare l'espansione del clone non solo per le urinocolture ma anche per l'analisi colturale di altri campioni.

Un altro dato che emerge dall'analisi dei risultati è che il “gap” tra incidenza di ceppi resistenti in comunità ed ospedale si sta sempre più riducendo. Anche questo fenomeno può dipendere dall'aumento dell'età della popolazione. Infatti, il progressivo invecchiamento della popolazione italiana si associa a un aumento delle comorbidità, dei ricoveri ripetuti e degli ingressi nelle residenze sanitarie assistenziali. Questi pazienti sono frequentemente sottoposti a molteplici trattamenti antibiotici e a ripetuti contatti con strutture sanitarie, condizioni che favoriscono la selezione e la

diffusione di microrganismi resistenti. Di conseguenza, l'antibiotico-resistenza non rappresenta più un fenomeno limitato all'ambiente ospedaliero, ma interessa sempre più spesso anche ceppi responsabili di infezioni acquisite in comunità, rendendo più complessa la scelta della terapia empirica e aumentando il rischio di fallimento terapeutico.

Ciò che è emerso, dai dati ottenuti, è la presenza di ceppi circolanti con differenti genotipi di resistenza agli antimicrobici (che hanno confermato gli antibiotipi) anche all'interno del Sequence Type ST1193, dimostrando che il quadro osservato non è solamente il risultato della diffusione monoclonale di un particolare microrganismo caratterizzato dagli stessi meccanismi di resistenza. Inoltre, l'analisi genotipica ha permesso di rilevare la resistenza al cefiderocol, molecola non comunemente testata per i ceppi uropatogeni, trattandosi di molecola di ultima generazione riservata solo per infezioni invasive gravi sostenute da germi gram-negativi resistenti ai carbapenemici. Ciò suggerisce che la resistenza a questa nuova molecola potrebbe essere più diffusa di quanto si pensi.

L'analisi genomica mediante WGS è stata finalizzata non solo all'identificazione delle linee clonali, ma anche dei determinanti genetici di antibiotico-resistenza e dei fattori di virulenza principali.

In tutti gli isolati è stata rilevata la presenza dei geni *iucABCD* codificanti gli enzimi responsabili della biosintesi dell'aerobactina e *iutA* codificante il relativo recettore di membrana esterna. Inoltre, tutti gli isolati possedevano i geni *ybt* e *irpI* componenti biosintetici, regolatori e di trasporto del sistema della yersiniabactina, e *fyuA* codificante il recettore necessario per l'importazione del complesso sideroforo-ferro. La coesistenza di entrambi i sistemi utili a favorire la persistenza batterica in condizioni di ridotta disponibilità di ferro suggerisce un potenziale vantaggio di fitness a livello delle vie urinarie.

Gli isolati appartenenti al ST1193 si distinguevano per la presenza di *usp*, gene frequentemente associato ai ceppi uropatogeni e codificante una proteina con attività genotossica e batteriocina-like, potenzialmente coinvolta sia nel danno cellulare sia nella competizione con altri microrganismi [105]

Al contrario, solo l'isolato appartenente al ST69 presentava il gene *hlyE*, codificante per l'emolisina E, una citolisina capace di formare pori nelle membrane delle cellule eucariotiche [106].

Tuttavia, pur avendo descritto in vari studi, tra cui il nostro, la presenza di numerosi fattori di virulenza, ad oggi, non si hanno prove di una aumentata patogenicità o fitness di *E. coli* ST1193 rispetto ad altri cloni.

In conclusione, l'analisi complessiva dei dati ottenuti ha fornito informazioni utili sui profili di resistenza nei ceppi uropatogeni e sulla diffusione di ceppi non fermentanti il lattosio come *E. coli* ST1193 in ambito nosocomiale e comunitario della nostra area geografica, contribuendo alla sorveglianza epidemiologica locale.

Saranno necessari ulteriori studi per comprendere le ragioni alla base del successo del clone ST1193 e per sviluppare strategie efficaci volte a limitarne la diffusione. La rapida espansione di questo clone, osservata sia in ambito ospedaliero sia comunitario, richiama quanto già avvenuto con il clone pandemico ST131 e sottolinea l'importanza di un'attenta sorveglianza microbiologica e genomica dei ceppi di *Escherichia coli* ad alto rischio.

Bibliografia

1. Gupta K, Grigoryan L, Trautner BW. Urinary tract infection. *Ann Intern Med*. 2017;167:ITC49–ITC64.
2. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28:1–13.
3. Bilsen MP, et al. Definitions of urinary tract infection in current research: a systematic review. *Open Forum Infect Dis*. 2023.
4. European Association of Urology. *EAU Guidelines on Urological Infections*. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology; 2024.
5. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Marra M, Zummo S, Biondo C. Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. 2023. PMID: 37111509.
6. Bonkat G, Bartoletti R, Bruyère F, et al. *EAU Guidelines on Urological Infections*. European Association of Urology; 2024.
7. Tandogdu Z, Wagenlehner FME. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(1):73–79.
8. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):625–663.
9. Nicolle LE. Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2014;3:23
10. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. *Nat Rev Microbiol*. 2015.
11. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. *Uropathogenic Escherichia coli and urinary tract infections*. 2017.
12. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli*. 2008.
13. Klein RD, Hultgren SJ. *Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies*. *Nat Rev Microbiol*. 2020.
14. Nicolle LE. *Catheter associated urinary tract infections*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2014.
15. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. *Nat Rev Microbiol*. 2004.
16. Sharma G et al. *Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies*. *J Appl Microbiol*. 2016
17. Riley LW. *Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli*. PMID: 33385193.
18. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. *Pathogenic Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:123–140.
19. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. *The bacterial cell envelope*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):a000414.
20. Welch RA, Burland V, Plunkett G III, et al. *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli CFT073*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):17020–17024
21. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. *Peptidoglycan structure and architecture*. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):149–167.
22. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. *Bacterial cell shape*. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(8):601–610.

24. Bush K, Fisher JF. *Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria*. Annu Rev Microbiol. 2011;65:455–478.
25. Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. *CTX-M enzymes: origin and diffusion*. Front Microbiol. 2012;3:110.
26. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group*. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):543–574.
28. Mazumder R, Hussain A, Phelan JE, Campino S, Haider SMA, Mahmud A, Ahmed D, Asadulghani M, Clark TG, Mondal D. *Non-lactose fermenting Escherichia coli: Following in the footsteps of lactose fermenting E. coli high-risk clones*. Front Microbiol. 2022;13:1027494. doi:10.3389/fmicb.2022.1027494.
29. Mobley HLT. *Virulence of uropathogenic Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2016.
30. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. *Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection*. Infection and Immunity. 2001;69(7):4572–4579.
31. Hannan TJ, Mysorekar IU, Chen SL, Walker JN, Jones JM, Pinkner JS, Hultgren SJ. *Leukocyte responses and regulation of intracellular bacterial community development in urinary tract infection*. Cellular Microbiology. 2010;12(4):419–431.
32. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. *Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections*. Science. 2003;301(5629):105–107.
33. Mysorekar IU, Hultgren SJ. *Mechanisms of uropathogenic Escherichia coli persistence and eradication from the urinary tract*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2006;103(38):14170–14175.
34. Carattoli A. *Plasmids and the spread of resistance*. Int J Med Microbiol. 2013;303(6–7):298–304.
35. Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S. *Family of Escherichia coli Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness*. J Infect Dis. 2001;183(Suppl 1):S24–S27.
36. Welch RA. *Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria*. Mol Microbiol. 1991;5(3):521–528.
37. Lemichez E, Aktories K. *Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection*. Exp Cell Res. 2013;319(15):2329–2336.
38. Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Baldassarri L, Bisicchia R, Ippolito G, et al. *Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of Escherichia coli causing extraintestinal infections*. J Clin Microbiol. 1987;25(1):146–149.
39. Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. *Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*. Infect Immun. 2002;70(12):7105–7113.
40. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HLT. *Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2000;38(1):53–66.
41. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. *Type V protein secretion pathway: the autotransporter story*. Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68(4):692–744.
42. Holland IB, Schmitt L, Young J. *Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway*. Mol Membr Biol. 2005;22(1–2):29–39.
43. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, et al. *The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(44):16502–16507.
44. Miethke M, Marahiel MA. *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(3):413–451.
45. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HLT. *Redundancy and specificity of Escherichia coli iron acquisition systems during urinary tract infection*. Infect Immun. 2011;79(3):1225–1235.
46. Stamm WE, Norrby SR. *Urinary tract infections: disease panorama and challenges*. J Infect Dis. 2001;183(Suppl 1):S1–S4.
47. Hultgren SJ, Schilling JD, Mulvey MA. *Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection*. Infect Immun. 2001;69(7):4572–4579.

48. Foxman B. *The epidemiology of urinary tract infection*. Nat Rev Urol. 2010;7(12):653–660.
49. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Reports*.
50. Stefani S, et al. *Antimicrobial resistance surveillance in Italy: epidemiology and clinical impact of ESBL-producing Enterobacterales*. Recent literature review.
51. World Health Organization. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Reports*
53. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 24th ed. Elsevier; 2021.
54. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. *Urinalysis: a comprehensive review*. Am Fam Physician. 2005;71(6):1153–1162.
55. Hooton TM. *Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection*. N Engl J Med. 2012;366(11):1028–1037.
56. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. *Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women*. N Engl J Med. 1982;307(8):463–468.
57. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Latest edition.
58. Patel R. *MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases*. Clin Chem. 2015;61(1):100–111.
59. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):380–407.
60. Bizzini A, Greub G. *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification*. Clin Microbiol Infect. 2010;16(11):1614–1619.
61. van Belkum A, Durand G, Peyret M, Chatellier S, Zambardi G, Schrenzel J, et al. *Rapid clinical bacteriology and its future impact*. Ann Lab Med. 2013;33(1):14–27.
62. Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. *Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology*. PLoS Pathog. 2012;8(8):e1002824.
63. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. *Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing*. Nat Rev Genet. 2012;13(9):601–612.
64. Wolfe AJ, Brubaker L. *"Sterile urine" and the presence of bacteria*. Eur Urol. 2015;68(2):173–174.
65. Brubaker L, Wolfe AJ. *The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders*. Ann Transl Med. 2017;5(2):34.
66. Neugent ML, Hulyalkar NV, Nguyen VH, Zimmern PE, De Nisco NJ. *Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection*. mBio. 2020;11(2):e00218-20.
67. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. *The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection*. Nat Rev Urol. 2015;12(2):81–90.
68. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, et al. *Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. hospitals*. N Engl J Med. 2018;379(18):1732–1744.
69. Johnson JR. *Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection*. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):80–128.
70. Pitout JDD, Laupland KB. *Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern*. Lancet Infect Dis. 2008;8(3):159–166.
71. Pitout JDD, DeVinney R. *Escherichia coli ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination*. F1000Research. 2017;6:195.
72. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. *Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(16):8829–8835.

73. Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. *Guideline for Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infections 2009*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)
74. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. *International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women*. Clin Infect Dis. 2011;52(5):e103-e120
75. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. *Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and Pseudomonas aeruginosa with Difficult-to-Treat Resistance*. Clin Infect Dis. 2024.
76. Logan LK, Weinstein RA. *The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace*. J Infect Dis. 2017;215(Suppl 1):S28–S36.
77. Nordmann P, Naas T, Poirel L. *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791–1798.
78. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. *Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study*. Lancet Infect Dis. 2010;10(9):597–602
79. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. *The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):565–591.
80. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. Clin Microbiol Rev. 2018;31(4):e00088-17.
81. Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, et al. *Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors*. Sci Transl Med. 2011;3(109):109ra115.
82. Han Z, Pinkner JS, Ford B, Chorell E, Crowley JM, Cusumano CK, et al. *Structure-based drug design and optimization of mannoside bacterial FimH antagonists*. J Med Chem. 2010;53(12):4779–4792.
83. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. *Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria*. Cell Host Microbe. 2019;25(2):219–232.
84. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. *Phage Therapy in the Postantibiotic Era*. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):e00066-18.
85. Górski A, Międzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B, et al. *Phage Therapy: Current Status and Perspectives*. Med Res Rev. 2020;40(1):459–463.
86. Kakasis A, Panitsa G. *Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review*. Int J Antimicrob Agents. 2019;53(1):16–21.
87. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, et al. *Intravesical bacteriophage therapy for urinary tract infections: clinical experience and future perspectives*. Nat Rev Urol. 2021;18(11):699–714.
88. Brubaker L, Wolfe AJ. *The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders*. Ann Transl Med. 2017;5(2):34.
89. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. *The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection*. Nat Rev Urol. 2015;12(2):81–90.
90. Stapleton AE. *The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection*. Microbiol Spectr. 2016;4(6):UTI-0025-2016.
91. Grin PM, Kowalewska PM, Alhazzan W, Fox-Robichaud AE. *Lactobacillus for preventing recurrent urinary tract infections in women: meta-analysis*. Can J Urol. 2013;20(1):6607–6614.
92. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*. Biomaterials. 2013;34(34):8533–8554.
93. Zhanel GG, Golden AR, Zelenitsky S, Wiebe K, Lawrence CK, Adam HJ, et al. *Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli*. Drugs. 2019;79(3):271–289.

94. Ito A, Nishikawa T, Ota M, Ito-Horiyama T, Ishibashi N, Sato T, et al. *Mechanism of Action of Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, Against Gram-Negative Bacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(12):7396–7401.
95. Jacob F, Monod J. *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. *Journal of Molecular Biology*. 1961;3:318–356. doi:10.1016/S0022-2836(61)80072-7
96. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. 16th ed. Pearson; 2021
97. Saha S, Dash M, et al. *Non-lactose fermenting Escherichia coli: following in the footsteps of lactose fermenting E. coli high-risk clones* *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:1027494. doi:10.3389/fmicb.2022.1027494
98. Naber, K. G. (2001). Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU): EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. *Eur. Urol.*, 40, 576-588
99. Pitout JDD, Peirano G, Chen L, DeVinney R, Matsumura Y. *Escherichia coli* ST1193: Following in the Footsteps of *E. coli* ST131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 Jul 19;66(7):e00511-22. doi:10.1128/AAC.00511-22.
100. Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR. Prevalence and characteristics of lactose non-fermenting *Escherichia coli* in urinary isolates. *J Infect Chemother*. 2014;20(11):738-740. doi:10.1016/j.jiac.2014.07.005.
101. Yaratha G, Perloff S, Changala K, et al. Lactose vs Non-Lactose Fermenting *E. coli*: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(Suppl 1):S589-S590. doi:10.1093/ofid/ofx163.1546.
102. Mazumder R, Hussain AH, Phelan JE, et al. Non-lactose fermenting *Escherichia coli*: Following in the footsteps of lactose fermenting *E. coli* high-risk clones. *Front Microbiol*. 2022;13:1027494. doi:10.3389/fmicb.2022.1027494.
103. Gajdács M, Ábrók M, Lázár A, Burián K. Differential epidemiology and antibiotic resistance of lactose-fermenting and non-fermenting *Escherichia coli*: Is it just a matter of taste? *Biol Futura*. 2020;71(1-2):175-182. doi:10.1007/s42977-020-00016-6.
104. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. *Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens*. *Pathogens*. 2021;10(10):1310. doi:10.3390/pathogens10101310.
105. Nipič D, Podlesek Z, Budič M, Črnigoj M, Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, *Usp*, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis*. 2013;208(10):1545-1552. doi:10.1093/infdis/jit480.
106. Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, et al. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*. 2000;100(2):265-276. doi:10.1016/S0092-8674(00)81564-0

