



Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di laurea in Biologia Molecolare e Sanitaria

***“Caratterizzazione fenotipica e genotipica di
un isolato clinico di *Klebsiella pneumoniae*
multiresistente”***

Relatore: Prof.ssa Anna Marchese

Candidato: Alessandro Maranzano

Correlatore: Prof. Vincenzo Di Pilato

Anno accademico 2020/2021

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento in particolare alla Dott.ssa Giulia Codda, per il supporto tecnico fornito.

Grazie a mamma, papà e Davide per la vicinanza nei momenti di difficoltà.

Sinceri ringraziamenti al Dott. Carlo Fortunato per il supporto psicologico fornito.

Sinceri ringraziamenti alla Prof.ssa Anna Marchese, al Prof. Vincenzo Di Pilato, al Prof. Eugenio Debbia, alla Dott.ssa Silvia Tornielli e all'Unità di Microbiologia dell'Università di Genova per l'ospitalità e per la pazienza avuta nei miei confronti.

INDICE

1. INTRODUZIONE pag.5

1.1. Il problema dell'antimicrobico-resistenza (AMR) pag.5

1.2. Meccanismi di resistenza agli antibiotici pag.9

1.3. Enterobatteri resistenti ai carbapenemi pag.11

1.4. *Klebsiella pneumoniae* produttore di NDM pag.14

2. SCOPO DEL LAVORO pag.17

3. MATERIALI E METODI pag.18

3.1 Isolati batterici pag.18

3.2 Condizioni di crescita e terreni di coltura pag.18

3.3 Spettrometria di massa MALDI-TOF pag.19

**3.4 Test di sensibilità agli antibiotici e determinazione della
Minima Concentrazione Inibente (MIC) pag.19**

3.5 Sequenziamento Illumina e Nanopore pag.20

3.6 Analisi di sequenza pag.23

3.7 Coniugazione plasmidica pag.24

3.8 Ricerca geni di resistenza mediante PCR pag.25

3.9 PCR-RAPD pag.27

3.10 Elettroforesi di acidi nucleici pag.28

4. RISULTATI E DISCUSSIONE pag.29

4.1 Caratterizzazione fenotipica del ceppo Kp-1Pi pag.29

4.2 Caratterizzazione genotipica del ceppo Kp-1Pi pag.30

4.3 Esperimento di coniugazione pag.36

4.4 Caratterizzazione molecolare dei transconiuganti pag.37

5. CONCLUSIONI pag.39

BIBLIOGRAFIA pag.41

1. INTRODUZIONE

1.1 Il problema dell'AMR

Con il concetto di resistenza agli antimicrobici (*antimicrobial resistance, AMR*) si indica una condizione in cui l'azione di un farmaco è inefficace nell'inibire reversibilmente o irreversibilmente la moltiplicazione di un microrganismo *in vivo*. Microrganismi come batteri, virus, funghi e anche alcuni parassiti, in alcuni casi sono in grado di resistere ai tradizionali trattamenti antimicrobici, che risultano essere inefficaci e quindi incapaci di debellarli.

In particolare, il fenomeno dell'antibiotico resistenza, negli ultimi decenni, è diventato un problema sempre più rilevante in ambito di Sanità e Salute pubblica: la comparsa di ceppi potenzialmente resistenti a tutti gli antibiotici disponibili e l'incapacità di trattare infezioni mediate da microrganismi MDR (Multi Drug Resistant), portano a porre particolare attenzione sugli interventi da attuare in ambito di studio e prevenzione, con il fine di arrivare alla completa risoluzione delle infezioni e ad una corretta gestione dei pazienti (1).

Come altre problematiche in ambito sanitario, anche il fenomeno dell'AMR, attualmente, viene inquadrato ed affrontato con un approccio di tipo “*One Health*”. Questo modello si basa sulla consapevolezza che salute umana, animale e ambientale si integrano in maniera indissolubile e si ricollega direttamente al concetto di Salute Globale che invece affronta gli aspetti socioeconomici della diffusione dell'Antibiotico Resistenza. (*Global Health*).

In particolare, il modello sanitario *One Health* si concentra sul ruolo di ecosistemi geograficamente vicini (e quindi strettamente collegati) nelle fasi di nascita e diffusione dell'AMR, focalizzando l'attenzione a livello locale e puntando sulla realizzazione di interventi mirati (2).

Sul piano pratico, questo concetto si basa principalmente sul fatto che i microbiomi (insiemi di geni del microbiota) di esseri umani, animali e piante, sono serbatoi connessi tra di loro tramite i quali i geni, come quelli coinvolti in meccanismi di antibiotico resistenza, possono essere trasferiti. Ne consegue il fatto che microrganismi che

colonizzano nicchie ecologiche ed ospiti diversi possono trasferire geni di resistenza con l'ausilio di molteplici elementi genetici del mobiloma (MGE) anche a patogeni umani, rendendoli più resistenti e complicandone il trattamento terapeutico (3).

Il problema è aggravato dal fatto che la recente riduzione della diversità genetica animale e vegetale, causata dalla selezione adoperata dall'uomo, e l'aumento del fabbisogno alimentare con il conseguente aumento massiccio di allevamenti e colture intensive, hanno causato di fatto una riduzione di biodiversità degli ospiti comuni a diverse comunità microbiche. Si è venuta così a creare una forte pressione selettiva che ha determinato la formazione di “serbatoi di resistenza” sia all'interno dell'uomo in ambienti nosocomiali e comunitari, così come negli animali allevati in tali ambienti (*Immagine 1*) (4).

L'uso di antibiotici nell'uomo, in termini quantitativi, appare nascosto dalla loro applicazione in zootecnica dato che, in realtà, due terzi del totale vengono somministrati agli animali. Gli antibiotici utilizzati come promotori della crescita sono stati vietati in molti paesi, tra cui l'UE, ma sono ancora consentiti in molti altri: circa 130.000 tonnellate di antibiotici sono state utilizzate a livello globale nella produzione di alimenti a base animale nel 2013, cifra che potrebbe salire a circa 200.000 tonnellate entro il 2030 (5). Alcuni stati e organizzazioni tra cui l'Unione Europea hanno adottato alcune politiche di riduzione del loro utilizzo per questi scopi anche se, al momento, risulta essere ancora consistente (circa 5000 tonnellate all'anno) (6).

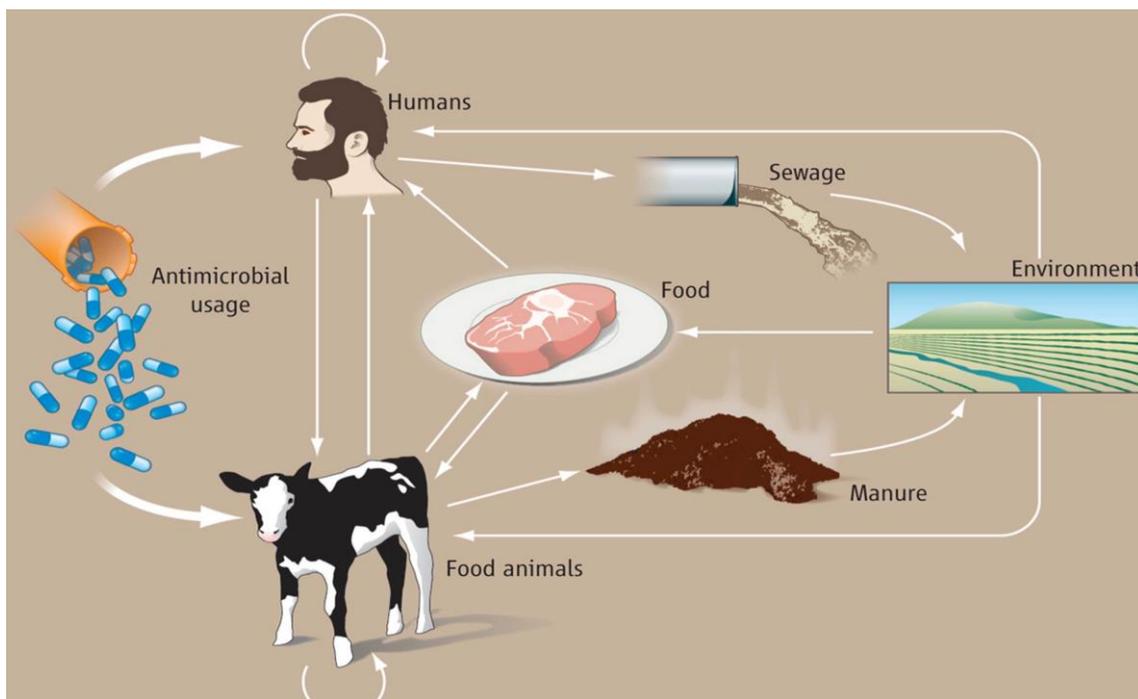


Immagine 1. Schema One Health.(Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment
 Mark Woolhouse, Melissa Ward et al. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>)

A tutto questo si aggiunge l'utilizzo degli antimicrobici a scopo terapeutico, fin dai principi della "medicina moderna", spesso adoperati anche quando non realmente necessari.

Il consumo straordinariamente elevato di antibiotici negli ospedali impone una forte pressione selettiva che guida l'evoluzione e la diffusione dell'AMR nei patogeni nosocomiali. Questi agenti patogeni che risiedono nell'ambiente ospedaliero accumulano meccanismi AMR, diventando così dei veri e propri "superbatteri".

Le specie batteriche coinvolte con maggior prevalenza in questi fenomeni, specialmente nell'ambito nosocomiale appartengono al gruppo ESKAPE (acronimo di *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter spp.*), specie Gram-positivi (Gram +) e Gram-negativi (Gram -) presenti nella flora microbica normale umana e animale, così come nell'ambiente e caratterizzate da una comune tendenza all'accumulo di molteplici resistenze a farmaci (7).

Ogni anno, più di 670.000 infezioni mediate da batteri con resistenza antibiotica si verificano nell'UE. Come diretta conseguenza, 33.000 persone muoiono di queste infezioni. Nell'Unione Europea, tra il 2007 e il 2015, il carico sanitario dei contagi causati da batteri resistenti agli antimicrobici in studio è aumentato notevolmente (8). Questo è testimoniato da alcuni fatti decisamente allarmanti: il tasso di mortalità attribuito a infezioni mediate da *E. coli* resistente alle cefalosporine di terza generazione è aumentato di quattro volte, mentre il tasso di mortalità dovuto a infezioni da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi – gruppo di antibiotici di ultima generazione – è aumentato di sei volte.

Queste sono tendenze preoccupanti, perché batteri di questo tipo possono diffondersi facilmente nelle strutture sanitarie, se non vengono applicate in tempi celeri misure appropriate.

La problematica si ripercuote anche in ambito socioeconomico. Infatti, come riportato da OECD, gli ospedali spendono, in media, da 10.000 a 40.000 dollari in più per curare un paziente infetto da un microrganismo resistente. Un recente rapporto stima che, rispetto a un mondo senza resistenza agli antibiotici, i paesi dell'OCSE potrebbero subire perdite cumulative di 2,9 trilioni di dollari (corrispondenti a circa lo 0,16% del loro PIL) entro il 2050 (9).

Lo sviluppo di nuovi agenti antibiotici con uno spettro di attività migliorato avrebbe il potenziale per mitigare alcuni degli effetti negativi della resistenza agli antibiotici, ma attualmente il loro sviluppo è molto lento. Dagli anni '80 c'è stata una drastica riduzione sia del numero di nuovi antibiotici approvati annualmente per la commercializzazione, sia del numero di grandi multinazionali farmaceutiche disposte a sviluppare attivamente farmaci antibatterici. Questo declino nella ricerca e nello sviluppo amplifica l'importanza clinica della resistenza agli antibiotici (10).

Per affrontare in modo concreto il problema dell'antibiotico resistenza e della diffusione dei microrganismi resistenti, occorre un impegno globale di tutti: professionisti sanitari per competenza e conoscenza, grazie alla loro formazione continua, esperienza e aggiornamento professionale; singoli cittadini che, informati e sensibilizzati riguardo il problema, possono contribuire adottando corretti comportamenti come il lavaggio delle

mani e l'assunzione di antibiotici solo quando effettivamente necessario e sotto attenta prescrizione medica. Infine, ma non per ordine di importanza, dovrebbe essere sensibilizzata la classe politica e dirigente, spesso attenta alle conseguenze (economiche e logistiche) piuttosto che alla vera origine del problema.

1.2 Meccanismi di resistenza agli antibiotici

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza può essere intrinseco in un determinato microrganismo, ma può essere mediato anche da fenomeni di "resistenza acquisita".

La resistenza acquisita deriva dalla selezione di una popolazione batterica, a causa della pressione esercitata dalla presenza di un antibiotico. Può essere di tipo cromosomico, rappresentando una proprietà specifica di un determinato ceppo, causata da mutazioni cromosomiche spontanee di geni. Le mutazioni spontanee, tuttavia, si realizzano con una frequenza estremamente bassa, nell'ordine di $10^7 - 10^{10}$ e non costituiscono, quindi, il meccanismo di resistenza prevalente. La trasmissione di questo tipo di resistenza avviene quindi durante le fasi del processo di divisione cellulare (evoluzione verticale), risultando meno problematico in ambito di diffusione dell'AMR.

I determinanti genetici più importanti e frequenti dal punto di vista epidemiologico sono invece associati ad elementi genetici mobili che ne favoriscono la diffusione all'interno di microrganismi dello stesso genere e specie e non (plasmidi, integroni, trasposoni) (11).

Geni di resistenza possono essere trasmessi orizzontalmente (evoluzione orizzontale) attraverso meccanismi di scambio di materiale genetico quali trasduzione, trasformazione e coniugazione (12). Ad aggravare la situazione è il fatto che questi fenomeni spesso riguardano più antibiotici, portando allo sviluppo di *resistenze multiple* (*MDR, multi-drug-resistance*).

Un esempio di resistenza mediata da trasferimento genico orizzontale è quella legata all'acquisizione di geni che codificano particolari enzimi denominati β -lattamasi. Questi enzimi sono in grado di idrolizzare la struttura degli antibiotici β -lattamici, che agiscono interferendo nella formazione dei legami peptidici tra le molecole del peptidoglicano bloccando così la sintesi della parete batterica e causandone un indebolimento con

conseguente morte del batterio per lisi osmotica (14). Le β -lattamasi possono essere distinte in varie tipologie, secondo la classificazione di Ambler:

- β -lattamasi di classe A (penicillinasi)
- β -lattamasi di classe B (metallo- β -lattamasi)
- β -lattamasi di classe C (cefalosporinasi)
- β -lattamasi di classe D (oxacillinasi)

Si differenziano non solo in base alla specifica classe di beta-lattamico degradato ma anche in base al meccanismo molecolare coinvolto; per le classi A, C, D il sito attivo vede coinvolta una serina mentre per la classe B sono coinvolti ioni di zinco (18).

Nell'ambito di questo tipo di resistenze i plasmidi rivestono un ruolo di fondamentale importanza: sono elementi genetici accessori, capaci di replicazione autonoma e che frequentemente trasportano varie tipologie di geni non necessari alla sopravvivenza del batterio. Tutti i plasmidi contengono una o più zone di origine della replicazione (ori) e in alcuni casi, i geni che consentono il loro trasferimento tra batteri (plasmidi coniugativi). In particolare, durante il fenomeno della coniugazione si ottiene naturalmente il trasferimento di un plasmide, da una cellula donatrice ad una cellula ricevente; il contatto ravvicinato tra le due cellule è uno dei principali fattori richiesti per questo tipo di meccanismo, in quanto la trasmissione avviene solo in seguito alla formazione di una struttura peculiare definita "pilo coniugativo" (13).

L'associazione tra plasmidi coniugativi e geni codificanti β -lattamasi è un fenomeno riportato frequentemente in letteratura, degno di nota e preoccupante, soprattutto in quei casi dove esistono resistenze intrinseche che vanno complessivamente a sommarsi con quelle ereditate per via orizzontale; un esempio emblematico è stato un focolaio d'infezione causato da un ceppo MDR avvenuto a Madrid nel 2013, che ha visto coinvolti più di 40 pazienti ricoverati in strutture di residenza protetta (17), causato da un clone di *K. pneumoniae* appartenente al *sequence type* (ST) 11, portatore intrinseco del gene *bla_{CTX-M-15}* (una β -lattamasi a spettro esteso o ESBL) coinvolto in un trasferimento di un plasmide coniugativo IncL/M contenente il gene *bla_{OXA-48}* (codificante per una carbapenemasi appartenente alle β -lattamasi di classe D, in grado di rendere inefficaci

anche i carbapenemi). Questo è un esempio di quei fenomeni precedentemente citati che sono alla base della riduzione di opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento delle infezioni. Esistono ulteriori meccanismi di resistenza che vedono coinvolti sistemi proteici di esporto e importo di molecole, tra cui gli antibiotici (es. pompe di efflusso e porine) i quali vengono interessati da fenomeni di mutazione in sequenza e/o aumentata espressione e costituiscono una modalità di adattamento fisiologico di tutti i microrganismi a condizioni ambientali più selettive.

1.3 Enterobatteri resistenti ai carbapenemi

Le *Enterobacteriaceae* sono una famiglia di batteri Gram - aerobi o anaerobi facoltativi che include varie specie batteriche commensali del microbiota e, in alcuni casi, patogeni dell'uomo, comunemente interessate da fenomeni di resistenza acquisita. Includono diverse specie quali ad esempio *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*

In un rapporto del 2013 del CDC (Center for Disease Control, U.S.A.) (15), le CRE (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*) sono state catalogate come una delle tre più importanti minacce nell'ambito dell'AMR, a causa della loro rapida diffusione su scala globale e dell'elevata propensione alla multiresistenza (MDR); è per questo che le CRE sono la causa di un elevato tasso di mortalità in pazienti con infezioni invasive (16).

L'aggiornamento Gennaio 2020 (N°1479-17/01/2020) della circolare N° 35470(Dicembre 2019, Ministero della Salute, Repubblica Italiana) specifica con maggiore precisione la definizione di caso di infezione da CRE, relativamente alla sorveglianza delle batteriemie da questi causati: “a) resistenza ad almeno un carbapenemico (ertapenem, imipenem o meropenem) e/o b) produzione di carbapenemasi e/o presenza di geni codificanti carbapenemasi confermata attraverso test di laboratorio.”

I carbapenemi sono una classe eterogenea di antibiotici facenti parte del gruppo dei β -lattamici, caratterizzati da un ampio spettro d'azione sia nei confronti dei batteri Gram- che dei Gram +, inclusi gli anaerobi, ad azione battericida e resistenti a diverse β -lattamasi. Le resistenze tra i carbapenemi si segnalano soprattutto tra i membri delle

Enterobacteriaceae. Sono in grado di attraversare le porine e di agire su diversi tipi di Penicillin Binding Proteins (PBP), inibendo così la sintesi del peptidoglicano. Sono da considerarsi a tutti gli effetti terapia di ultima scelta, in quanto unica alternativa agli altri β -lattamici in caso di infezione da ceppi produttori di ESBL.

Attualmente sono conosciuti almeno tre meccanismi di resistenza ai carbapenemi nelle *Enterobacteriaceae*:

- (1) produzione di β -lattamasi in grado di idrolizzare i carbapenemi (carbapenemasi), di solito localizzate nello spazio periplasmatico. Negli enterobatteri, le carbapenemasi più comuni ed importanti al punto di vista epidemiologico sono KPC (classe A), NDM, VIM, IMP (classe B), OXA-48 (classe D). È il meccanismo più frequente in assoluto (18);
- (2) over-espressione di pompe di efflusso, in grado di estrarre attivamente i carbapenemi dalla cellula batterica (consumando ATP o utilizzando un gradiente protonico di membrana) limitandone così la presenza nell'ambiente intra-cellulare (in realtà evidenziato maggiormente in *Pseudomonas* e più raramente nelle *Enterobacteriaceae*);
- (3) mutazioni in o perdita di porine, privando la cellula batterica dei normali canali che consentono l'ingresso di antibiotici attraverso la loro membrana esterna (per esempio, a causa di alcuni eventi di ricombinazione genetica che riducono l'affinità alle penicillin binding proteins o PBP).

È da sottolineare il fatto che l'iper-espressione di pompe di efflusso e la perdita delle porine mediano la resistenza a diverse classi antimicrobiche, contribuendo allo sviluppo di ceppi MDR (19), in quanto frequentemente si osserva la combinazione di questi tratti di resistenza spostandosi verso fenotipi di resistenza complessa.

I dati sull'andamento dell'antibiotico resistenza in Europa, sono riportati dalla European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Negli ultimi anni in Italia si è osservato un deciso aumento di ceppi di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi: mentre nel 2009 solo l'1.3% dei ceppi isolati da emocultura era resistente, questa percentuale è salita al 33.9% nel 2016.

Secondo alcuni studi condotti negli ultimi anni (21), il tasso di mortalità a 30 giorni dalla diagnosi di infezioni invasive da parte di CRE, è notevolmente più alto rispetto al tasso di mortalità delle medesime infezioni causate da batteri non resistenti: in alcuni casi è stato riportato un tasso prossimo al 65% per le prime, contro un 25-50 % relativo alle seconde.

La problematica relativa alle infezioni mediate da CRE è legata principalmente alla realtà nosocomiale. Infatti, sono predisposti allo sviluppo di infezioni pazienti già compromessi e debilitati a causa di comorbidità quali tumori, insufficienza renale o epatica, diabete mellito, patologie cardio-vascolari, ricoverati in reparti cosiddetti “a rischio” (terapia intensiva, chirurgia ed ematologia) e soggetti a posizionamento di dispositivi medici innestati o a manovre invasive. Inoltre, insufficienti azioni di “infection control and prevention” e di sorveglianza epidemiologica contribuiscono largamente a questo fenomeno.

Per limitare la diffusione di questi microrganismi in ambito nosocomiale, sono state stilate procedure di controllo suggerite dalle linee guida internazionali (ECDC) che prevedono:

- l’identificazione precoce dei pazienti a rischio di colonizzazione e/o infezione tramite screening con tamponi rettali al momento dell’accesso in struttura;
- la sorveglianza continua dei pazienti colonizzati e/o infetti
- l’isolamento di tutti i soggetti infetti o colonizzati e l’adozione da parte del personale sanitario delle precauzioni da contatto nella gestione di questi pazienti.
- la segnalazione tempestiva dei casi alle autorità sanitarie competenti (22).

1.4 *Klebsiella pneumoniae* produttore di carbapenemasi di tipo NDM

K. pneumoniae è batterio Gram -, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, normalmente presente nel microbiota, in grado di colonizzare la cute e il tratto respiratorio superiore. Una larga percentuale di infezioni causate da *K. pneumoniae* MDR sono contratte in ambito nosocomiale e includono prevalentemente infezioni dell'apparato respiratorio e batteriemie. Con il passare degli anni questo batterio ha sviluppato resistenza a diverse classi di antibiotici, limitando così le opzioni terapeutiche disponibili. Negli ultimi anni, la produzione di ESBL capaci di rendere inefficaci i β -lattamici ad ampio spettro, incluse le cefalosporine di terza e quarta generazione, ha portato ad un aumento dell'uso dei carbapenemi in terapia e quindi favorito la veloce diffusione delle resistenze a quest'ultima classe di antibiotici. La resistenza ai carbapenemi spesso insorge in ceppi già resistenti ad altre classi di antibiotici (cefalosporine di terza o quarta generazione e fluorochinoloni).

New Delhi metallo- β -lattamasi (NDM) è una carbapenemasi appartenente alla classe delle β -lattamasi di classe B, note anche come tipo di metallo- β -lattamasi, in grado di idrolizzare la maggior parte dei β -lattamici (compresi i carbapenemi) ma non i monobattami (23). L'idrolisi dei β -lattamici da parte degli enzimi NDM non può essere prevenuta neanche dagli inibitori delle β -lattamasi di ultima generazione ad oggi disponibili, inclusi avibactam, vaborbactam e relebactam. Il primo enzima di tipo NDM (NDM-1) è stato identificato per la prima volta in un ceppo di *K. pneumoniae* isolato da un paziente svedese ricoverato in ospedale a Nuova Delhi, in India, nel 2008 (23). Da allora, NDM-1 è stato trovato in varie specie di *Enterobacteriaceae*, ma anche in Gram - non-fermentanti come *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, e ne sono state identificate più di 24 varianti. I ceppi NDM-positivi sono generalmente resistenti alla maggior parte degli agenti antimicrobici oltre ai β -lattamici a causa della coesistenza di altri geni di resistenza e possono causare una varietà di infezioni che sono state segnalate per il loro alto tasso di mortalità (24). *K. pneumoniae* ed *E. coli* sono i microrganismi produttori di NDM riscontrati più frequenti, la cui diffusione a livello globale è favorita dalla presenza di cloni epidemici di successo (high risk clones), come ad esempio ST11, ST512, ST147 per *K. pneumoniae* ed ST131 per *E. coli* (24).

Sebbene il gene *bla_{NDM}* sia stato trovato anche a livello cromosomico in diversi ospiti, nella maggior parte dei casi è localizzato a livello plasmidico, aspetto che aumenta il potenziale di diffusione di questo determinante di resistenza (25).

I dati dal sistema di sorveglianza dell'ECDC per le infezioni dovute a CRE hanno indicato un aumento dei casi di infezione da *Kp-NDM* tra novembre 2018 e maggio 2019 che ha interessato la regione Toscana (area nord-ovest) mentre alcuni casi sporadici sono stati registrati in altre quattro regioni: Liguria (due casi), Emilia-Romagna, Lazio e Piemonte (un caso ciascuna). Dalla fine del 2018, solo in Toscana, sono state segnalate 375 infezioni mediate da questi microrganismi (26). Nel 2019, secondo dati rilevati dall'Istituto Superiore di Sanità in tutto il territorio nazionale sono stati segnalati 2.457 casi di batteriemie da CPE, dato in aumento rispetto al triennio 2016- 2018. La grande maggioranza di queste batteriemie è stata causata da *K. pneumoniae* (97,4%), con la maggiore incidenza di casi rilevati in Centro-Italia. In più dell'80 % dei casi al momento della comparsa dei primi sintomi, i pazienti risultavano ricoverati in ospedale e oltre il 50% dei pazienti avevano tra i 60 e i 79 anni di età. Nell'83.3 % dei campioni risultati positivi per *K. pneumoniae* sottoposti a test genotipico per determinare la tipologia di meccanismo di resistenza ai carbapenemi (140 su 168 campioni) è stata rilevata la presenza di NDM; il trend risulta essere significativamente in aumento rispetto al 37,8% del biennio precedente (14 su 37 campioni) (27), tenendo conto comunque del ridotto numero di test effettuati negli studi precedenti.

In qualche caso sono stati individuati alcuni cloni epidemici caratterizzati da particolari fattori di virulenza. I fattori di virulenza di *K. pneumoniae* sono associati ad un alto tasso di mortalità e aumentata difficoltà nel trattamento terapeutico. La maggior parte degli studi classificano i geni di virulenza in quattro classi principali, tra cui fimbrie di tipo I e III, lipopolisaccaride, siderofori (sistemi di assorbimento del ferro libero) e capsula polisaccaridica. Certamente la distinzione dei ceppi ipervirulenti rispetto a quelli classici dal punto di vista fenotipico non è semplice. In letteratura sono stati riportati come ceppi ipervirulenti quelli caratterizzati dalla presenza di plasmidi di grandi dimensioni (superiori alle 200.000 basi) che presentano caratteri di virulenza specifici che vanno ad aggiungersi a quelli presenti nel cromosoma. Alcuni geni codificanti per caratteri di virulenza sono: *iuc* e *ybt* (geni biosintetici per aerobactina e yaersiniabactina, alcuni tipi

di siderofori), *peg-344* (un trasportatore metabolico la cui funzione dettagliata è attualmente sconosciuta) e *rmpA* e *rmpA2* (geni regolatori che aumentano la produzione di capsula) (28).

Negli ultimi anni, l'aumento della prevalenza di alcune linee clonali ipervirulente di *K. pneumoniae* (hvKP) ha sollevato preoccupazioni in tutto il mondo, a causa della sua capacità di causare gravi infezioni anche in giovani individui sani. Queste infezioni sono state osservate con un'incidenza più elevata in comunità, e caratterizzate da una diffusione metastatica in vari distretti addominali che avviene per via ematica (batteriemia) raggiungendo anche il fegato in cui possono generare ascessi. Sono state altresì osservate polmoniti gravi associate ad infezione da hvKP con frequenza maggiore rispetto ai ceppi classici, endoftalmiti e, talvolta, meningiti (28).

Sebbene sia noto da tempo che l'acquisizione di ferro è fondamentale per la virulenza, una nuova osservazione fatta di recente è che le linee clonali hvKP producono quantitativamente più molecole per l'acquisizione di ferro (siderofori), che sembrano essere biologicamente più attive (aumento dell'affinità per il ferro o resistenza ai fattori dell'ospite) rispetto a quelli prodotti da ceppi non hvKP. Questa proprietà è stata evidenziata in un modello murino, *in vivo*, di infezione metastatica, dove si è visto l'aumentare della virulenza e della resistenza di hvKP all'attività battericida mediata dal complemento (29). La popolazione di *K. pneumoniae* multiresistente che non mostra il fenotipo di ipermucoviscosità o comunque di ipervirulenza (cKP) è normalmente responsabile di infezioni nosocomiali in pazienti con comorbidità; in precedenza si pensava che non potesse esserci sovrapposizione tra le caratteristiche di queste due popolazioni. Sfortunatamente è stato osservato che, in alcuni casi, i tratti di virulenza e resistenza possono convergere per produrre ceppi che sono in grado di causare infezioni invasive gravi e difficilmente trattabili, il che rappresenta un importante problema di salute pubblica (30).

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di vista fenotipico e genotipico un isolato clinico di *K. pneumoniae* MDR produttore di carbapenemasi di tipo NDM, causa di un'infezione nosocomiale, al fine di acquisire informazioni su:

- Meccanismi genetici alla base del fenotipo di multiresistenza
- Complessità e caratteristiche degli elementi genetici mobili associati al resistoma
- Presenza di eventuali fattori di virulenza acquisita.
- Mobilizzazione di fattori di resistenza e virulenza

3. MATERIALI E METODI

3.1 Isolati batterici

Nel presente studio è stato caratterizzato un isolato clinico multiresistente di *K. pneumoniae* KPC (Kp-1Pi), causa di infezione invasiva (batteriemia in un paziente ospedalizzato).

Negli esperimenti di coniugazione è stato inoltre utilizzato come ricevente l'*E. coli* 1R-716 (F2 Lac - his pro trp StrR).

3.2 Condizioni di crescita e terreni di coltura

Tutti gli isolati adoperati durante l'esperimento sono stati conservati a -80 °C, in congelatore, in terreno Muller Hinton Broth (MHB) addizionato con glicerolo al 20%.

I diversi terreni di coltura o i loro componenti sono stati forniti dall'azienda Biolife (Biolife Italiana s.r.l., Milano, Italy), tra cui il Muller Hinton agar (MHA) (estratto di carne 3 g/L, digerito acido di caseina 17.5 g/L, amido 1.5 g/L, agar 14 g/L) ed il MHB.

In tutti gli esperimenti le colture batteriche sono state mantenute in condizioni aerobiche alla temperatura di 28° C, ove non specificato diversamente. Per la coniugazione sono stati messi inocoli Over Night (O.N.) a 37°C ed è stata poi aggiustata la concentrazione il giorno seguente misurando la Densità Ottica (O.D.) dell'inoculo con lo spettrofotometro Ultrospec 2100 pro – Amersham Biosciences .

3.3 Spettrometria di massa MALDI-TOF

L'identificazione batterica è stata determinata grazie alla spettrometria di massa MALDI-ToF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Il campione da analizzare, in questo caso una singola colonia batterica, posizionato su un'apposita matrice (si aggiunge 1µl di matrice realizzata in acido α -ciano4-idrossicinnamico, fonte di protoni necessari alla ionizzazione del campione), viene colpito da un raggio laser che provoca la frammentazione delle sue molecole e la successiva ionizzazione dei frammenti ottenuti; queste particelle, dotate ora di carica elettrica uniforme, vengono poi convogliate all'interno di un campo elettrico che le accelera e le indirizza attraverso un percorso obbligato sino ad un sensore, che misura il rapporto massa/carica elettrica di ogni singola particella.

Il sensore invia poi un segnale ad un computer che codifica tale segnale (tramite un software apposito) in un picco su di un sistema di riferimento cartesiano; si ottiene così alla fine un tracciato (lo Spettro) formato da un insieme di picchi. Lo spettro di massa batterico ottenuto è quindi l'insieme delle componenti peptidiche o loro frammenti rilasciati in seguito alla rottura della parete batterica. Ogni spettro è così distintivo ed unico per un particolare microrganismo, in base ovviamente alla sua specifica composizione molecolare. Confrontando lo spettro ottenuto con quelli presenti in appositi database, è possibile identificare tutti i microrganismi individualmente presenti in esso grazie quindi alle loro caratteristiche biomolecolari.

3.4 Test di sensibilità agli antibiotici e determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il test di sensibilità agli antibiotici è stato allestito secondo le linee guida di CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) e EUCAST v. 11.0 / 2021. È stato preparato un inoculo batterico con torbidità pari a 0.5 McFarland ($\approx 1.5 \times 10^8$ CFU/mL), successivamente diluito (50 µL in 11 mL) fino a raggiungere una concentrazione di $\approx 6.8 \times 10^5$ CFU/mL. Infine, 100 µL di quest'ultima sospensione sono stati dispensati in ciascun pozzetto di

una piastra multiwell commerciale (MERLIN Diagnostika GmbH), contenente farmaci antimicrobici liofilizzati: amikacina, amoxicillina/acido clavulanico, cefepima, ceftazidima, ceftazidima/avibactam, ceftozalan/tazobactam, ceftriaxon, ciprofloxacina, colistina, ertapenem, fosfomicina, gentamicina, levofloxacina, meropenem, piperacillina/tazobactam, tigeciclina, trimethoprim/sulfametoxazolo.

Gli antibiogrammi così allestiti sono stati successivamente incubati a 37 °C per 18 ore prima della lettura dei risultati. I valori di MIC sono stati interpretati utilizzando i breakpoints EUCAST per la determinazione dei profili di sensibilità/resistenza.

3.5 Sequenziamento Illumina e Nanopore

La caratterizzazione genotipica del ceppo Kp-1Pi è stata effettuata mediante due tecnologie diverse di sequenziamento genomico: Illumina HiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) presso l'azienda Novogene Co., Ltd. (Cambridge, United Kingdom), utilizzando un approccio 2×150 bp paired-end e MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Università degli Studi di Genova.

La tecnica Illumina si basa su un processo di tipo “Sequencing by Synthesis”, in cui il sequenziamento avviene a partire da una libreria di frammenti di DNA successivamente denaturati e legati ad alcuni oligonucleotidi alle estremità 5' e 3', che fungono da sequenze adattatrici, complementari ad altri oligonucleotidi aderenti ad una flow cell, divisa in corsie. L'amplificazione è consentita da una polimerasi. Ogni frammento aderente all'oligonucleotide complementare sulla flow cell viene amplificato alla stessa temperatura; i frammenti originali vengono rimossi, mentre quelli originati dall'amplificazione aderenti alla flow cell si “ripiegano” e vanno a costituire la cosiddetta “struttura a ponte” tramite un'ulteriore amplificazione (*Bridge amplification*). In questo caso, entrambi i filamenti (originale e complementare) rimangono aderenti alla flow cell, ottenendo così complessivamente un'amplificazione di entrambi i filamenti, forward e reverse, per ciascun frammento generato. Questo processo genera milioni di *cluster* a ridosso della flowcell. Successivamente inizia la fase di sequenziamento vero e proprio: i filamenti reverse vengono rimossi e per ognuno dei filamenti rimasti adesi alla flowcell

viene sintetizzato un filamento complementare grazie a un primer di sequenziamento e per ogni nucleotide inserito viene visualizzato un segnale fluorescente in seguito ad eccitazione da parte di una sorgente luminosa. Ogni segnale luminoso ricevuto dal detector viene convertito in una specifica base. Lo stesso processo avviene in maniera analoga per il filamento reverse, grazie a una nuova fase di amplificazione distinta.

MinIon Nanopore invece è un sequenziatore che sfrutta la tecnologia dei nanopori, proteine presenti in natura che fungono da passaggio tra due sistemi. L'idea alla base di questa tecnica è che un singolo filamento di DNA possa essere guidato, tramite elettroforesi, attraverso un nanoporo, foro in una membrana isolante o semiconduttrice, dal diametro leggermente maggiore rispetto a quello del filamento (1.8-2 nm). A lati della membrana, posta all'interno di una soluzione, vengono posizionati due elettrodi. In assenza del polinucleotide, il sistema crea una corrente di ioni attraverso il canale creato dal poro, generando una corrente di base. A causa della carica negativa presente sui gruppi fosfato che costituiscono l'impalcatura del filamento nucleotidico, la sequenza di DNA viene attratta dal catodo attraversando il poro bloccando parzialmente il flusso di ioni. Nonostante la carica negativa dei gruppi fosfato, il loro contributo in corrente è molto piccolo, poiché si muovono lentamente rispetto agli ioni liberi; ciò induce una differenza di potenziale che permette di rivelare la traslocazione del polinucleotide, la sua lunghezza, la sua composizione e dinamica. La determinazione della sequenza avviene durante questo passaggio. Lo strumento è gestito da un software proprietario, denominato MinKNOW, che permette l'acquisizione e l'analisi in tempo reale dei dati di sequenziamento, ottenuti sottoforma di reads con una lunghezza nell'ordine delle kilobasi (kb). MinION si basa sull'utilizzo di una Flow Cell che presenta 512 canali, ognuno connesso a 4 pozzetti contenenti un nanoporo inserito in un doppio strato di una membrana elettricamente resistente. Ogni canale, quindi, registra dati da uno dei quattro pozzetti alla volta, permettendo il sequenziamento simultaneo fino a 512 molecole indipendenti di DNA.

Il sequenziamento mediante MinION ha previsto una fase di estrazione del DNA per la preparazione di Librerie ShotGun senza necessità di una successiva amplificazione

mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Il DNA da sequenziare doveva però rispettare determinati parametri:

- Frammenti di lunghezza maggiore di 30 kb
- Una quantità corrispondente a circa 55 ng/μl di DNA, per un totale di 400ng richiesto per l'allestimento delle librerie Shotgun.

Il DNA genomico totale è stato estratto da brodoculture O.N. (Over Night), usando il kit Qiagen “DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) come da istruzioni della casa madre. Questo tipo di estrazione si avvale di una lisi chimica e fisica mediante l'utilizzo di biglie. Il DNA è stato quindi quantificato mediante Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA.). Per la preparazione delle librerie di DNA, è stato utilizzato il kit Oxford Nanopore “Rapid Barcoding Sequencing” (SQK-RBK004). Il Kit prevede l'utilizzo del reagente “Fragmentation MIX RB” necessario per “taggare” il DNA d'interesse, ovvero mediando il legame con adattatori oligonucleotidici (Barcode) che, nelle fasi successive, permetteranno di discriminare le reads di ogni campione facente parte della stessa libreria. In una provetta da 0,2 ml sono stati mixati:

- 7,5 μl di campione (400ng di DNA da portare a volume con H₂O DNAsi/RNasi free)
- 2,5 μl di Fragmentation MIX RB

Affinché avvenisse il legame tra DNA e Barcode, sono state effettuate le seguenti fasi di incubazione:

Temperatura	Tempo
30°C	1'
80°C	1'

Al termine di questo step, è stata effettuata una fase di clean-up con l'utilizzo di biglie magnetiche in rapporto 0.6:1 con il volume del campione e lavaggi in etanolo al 70%.

Come ultimo passaggio, è stato necessario aggiungere a 10 µl della libreria, 1 µl del reagente RAP (Rapid Adapter) contenente gli adattatori leader precaricati con proteine motrici che legandosi alle porzioni 5' e 3' del filamento permettono la movimentazione del DNA attraverso i nanopori.

Al termine della preparazione, la libreria è stata caricata nella Flow Cell, come da istruzioni della casa madre. Questa fase ha previsto l'utilizzo della Flow Cell Priming MIX contenente oligonucleotidi che fungono da ponte per il legame del DNA con la membrana. La libreria preparata precedentemente invece, è stata mixata con un Buffer di sequenziamento e biglie di caricamento atte a guidare le sequenze di DNA all'interno della FlowCell.

3.6 Analisi di sequenza

Entrambe le modalità di sequenziamento hanno generato dati che comprendono sia l'informazione della sequenza nucleotidica delle reads prodotte, sia i dati di qualità delle singole basi sequenziate, utilizzabili sotto forma di file FASTQ. Tali file sono stati successivamente utilizzati per l'assemblaggio del genoma batterico, utilizzando SPAdes Genome Assembler v. 3.11 (Bankevich et al.). L'analisi del genoma assemblato è stata condotta utilizzando web-tool dedicati disponibili sulla piattaforma Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/>) sviluppata dal Wellcome Sanger Institute, in grado di fornire informazioni dettagliate su determinanti di resistenza, virulenza, clone batterico, e tipologia di plasmidi presenti. Questa piattaforma database di sequenze curati dal Center for Genomic Epidemiology (CGE), che offre la possibilità di utilizzare diversi tool per la caratterizzazione genotipica di isolati batterici utilizzando il dato dell'intero genoma.

Lo screening per le sequenze fagiche è stato eseguito utilizzando PHASTER (<https://phaster.ca/>).

3.7 Coniugazione plasmidica

L'attenzione si è focalizzata sullo studio della capacità di trasferimento dei plasmidi presenti nel ceppo in esame. Per fare questo, è stato utilizzato, come microrganismo ricevente, il ceppo di laboratorio *E. coli* 1R716 (*Lac*-; *StrR*). Gli esperimenti di coniugazione sono stati allestiti in MHB, a partire da inoculi O.N. cresciuti in condizioni ambientali controllate (temperatura di crescita di 28 °C), ponendo il donatore ed il ricevente in un rapporto di 1:10 ($10^8/10^9$ rispettivamente, in un volume finale di 2 ml). Il numero di cellule è stato stimato mediante letture spettrofotometriche (Ultrospec 2100 pro – Amersham Biosciences) a 600 nm, utilizzando il seguente rapporto di conversione: $OD_{600}=1 \approx 1 \times 10^9$ CFU/ml. Dopo incubazione della miscela di coniugazione sono state effettuate una serie di diluizioni scalari 1:10 in soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl), e sono stati piastrati 100 µl delle diluizioni 10^{-5} e 10^{-6} per la selezione del donatore su terreni selettivi con cefotaxime (1 µg/mL) e 100 µl dell'intero e della diluizione 10^{-1} per la selezione del transconiugante su terreni selettivi addizionati con streptomina (500 µg/mL) e cefotaxime (1 µg/mL). La frequenza di coniugazione è stata calcolata come rapporto di cellule transconiuganti su cellule di donatore (t/d), secondo la seguente formula:

$$\frac{\text{Titolo } \frac{CFU}{ml} \text{ delle cellule transconiuganti}}{\text{Titolo } \frac{CFU}{ml} \text{ delle cellule donatore}}$$

*Unità Formanti Colonia

Sono state allestite, inoltre, alcune piastre di MHA addizionate con altre combinazioni di antibiotici, per creare differenti ambienti selettivi nei confronti dei transconiuganti.

In particolare:

- Amikacina (0,004 mg/ml) - cefotaxime (0,002 mg/ml)
- Meropenem (0,001 mg/ml) - cefotaxime (0,002 mg/ml)
- Meropenem (MEM)- cefotaxime (CTX) - amikacina (AMK) (0,001 mg/ml; 0,002 mg/ml; 0,004 mg/ml)

3.8 Ricerca di geni di resistenza mediante PCR

Le analisi sono state effettuate sia sullo stipite in esame (utilizzato come controllo) sia nei cloni transconiuganti, per determinare quali geni utilizzati come “marker” sono stati effettivamente trasferiti e quindi di riflesso quali plasmidi sono stati ereditati.

La PCR è una tecnica di biologia molecolare utilizzata per amplificare specifici frammenti di acidi nucleici dei quali sono note le sequenze nucleotidiche iniziali e finali (Mullis KB, 1990). Essa permette l'amplificazione in vitro di un determinato frammento di DNA (template), grazie ad una coppia di oligonucleotidi (primers), complementari alle due estremità della sequenza che si vuole amplificare, che hanno la funzione di innesco. Oltre agli oligonucleotidi specifici, sono necessari alla reazione: una DNA-polimerasi termostabile in grado di sintetizzare la sequenza che si desidera amplificare su uno stampo esistente; desossinucleotidi trifosfato (dNTPs) che vengono inseriti nella catena nascente di DNA; un tampone a concentrazioni idonee di ioni per l'attività della DNA-polimerasi. L'amplificazione si realizza attraverso una serie di cicli, ciascuno dei quali comprende tre fasi che hanno luogo a temperature diverse: 1) denaturazione (94-96°C); 2) ibridazione (valore che varia a seconda della temperatura di appaiamento o annealing del complesso primer-template, T_m); 3) polimerizzazione o elongation (72°C, temperatura ottimale per l'attività delle DNA polimerasi termostabili). La ripetizione di questi cicli porta ad un'amplificazione esponenziale della sequenza nucleotidica. Le reazioni di PCR, se non altrimenti specificato, sono state effettuate in un volume di 20 µl. L'elettroforesi su gel per l'analisi delle bande è stata condotta in apposita cella, utilizzando 100 ml di TAE Buffer 1x e agarosio all'1,5%.

I protocolli di PCR e i reagenti utilizzati durante l'esperimento sono esemplificati nelle seguenti tabelle:

Componente	Volume singola reazione (conc. finale)
Buffer (1X)	2.5 μ L (1X)
dNTPs (100 M)	0.5 μ L (10 mM)
Primer MIX (100 μ M)	1.5 μ L (20 μ M)
Acqua	15.4 μ L
Taq polimerasi (500 unit�/�l)	0.1 μ L (50 unit�)
Volume finale	20 μ L

Tabella 1. Reagenti per singola reazione: buffer (tampono di reazione), deossinucleotidi trifosfato, primer mix (forward & reverse), acqua libera da nucleasi e polimerasi termostabile. (per ciascuna reazione sono stati aggiunti 5 μ L di campione)

	<i>bla</i> CTX-M	<i>armA</i>	<i>bla</i> NDM
Denaturazione iniziale	94 $^{\circ}$ C, 3 min	95 $^{\circ}$ C, 2 min	95 $^{\circ}$ C, 3 min
Denaturazione	94 $^{\circ}$ C, 50 sec	94 $^{\circ}$ C, 30 sec	95 $^{\circ}$ C, 30 sec
Annealing	55 $^{\circ}$ C, 50 sec	55 $^{\circ}$ C, 1 min	57 $^{\circ}$ C, 45 sec
Estensione	72 $^{\circ}$ C, 1 min	72 $^{\circ}$ C, 1 min	72 $^{\circ}$ C, 1 min
Estensione finale	72 $^{\circ}$ C, 5 min	72 $^{\circ}$ C, 7 min	72 $^{\circ}$ C, 5 min
Storage	10 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C
Cicli totali	35	30	30

Tabella 2. Protocolli di amplificazione.

3.9 PCR-RAPD

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) è una metodica basata sulla amplificazione di segmenti random di DNA mediante l'uso di un unico primer di 10 bp (decamero). Essendo molto piccolo, questo primer si lega a vari segmenti del template fornendo amplificati con pesi molecolari diversi che vengono separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Il risultato ottenuto è un pattern specifico di bande che consente di identificare cloni uguali, diversi o correlati. In questo lavoro di tesi la genotipizzazione RAPD è stata effettuata come precedentemente descritto da Pacheco et al. (Pacheco AB et al., 1997) con il decamero 1290. Le reazioni di PCR sono state effettuate in 25 µl finali di cui 2,5 µl di tampone di reazione 10X, 0,5 µl di una miscela di desossi-nucleotidi (1,25mM), 1,5 µl del primer 1278 (10pmol/µl); 15,4µl di H₂O sterile; 0,1 µl di Taq-DNA polimerasi (5,0 U/µl) (Taq DNA Polymerase, 5 U/ µl Biotechrabbit®) e 5 uL ng di DNA. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato il seguente:

Denaturazione iniziale	94 °C, 3 min
Denaturazione	95 °C, 1 min
Annealing	38 °C, 5 min
Estensione	72 °C, 3 min
Estensione finale	72 °C, 2 min
Storage	4 °C, 8 min
Cicli totali	45

Tabella 3. Protocollo RAPD

3.10 Elettroforesi di acidi nucleici

L'elettroforesi su gel è la tecnica per mezzo della quale è possibile separare gli acidi nucleici in base al loro peso molecolare. Viene effettuata in gel di agarosio polimerizzato a diverse concentrazioni (0,75%, 1,2%, 2% p/v), scelto in base alla grandezza dei prodotti di DNA. L'elettroforesi avviene all'interno di una cella elettroforetica contenente il tampone di corsa TAE concentrato 1x (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) a contatto con gli elettrodi, il polo negativo (catodo) e quello positivo (anodo). Dato che le molecole di DNA hanno una carica negativa (a causa del legame fosfodiesterico che si forma fra un nucleotide e quello successivo) e differenti grandezze, migrano verso il polo positivo e con diverse velocità (quelle ad alto peso molecolare si muovono più lentamente di quelle a basso peso molecolare). Al termine della migrazione, il DNA è stato visualizzato mediante colorazione con etidio bromuro ed osservato al transilluminatore a raggi UV ($\lambda=302$ nm). I marcatori di peso molecolare utilizzati come riferimento sono stati: DNA Molecular Weight Merker XIV, 100 base pair ladder. (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

L'elettroforesi su gel per l'analisi delle bande è stata condotta in apposita cella, utilizzando 100 ml di TAE Buffer 1x e agarosio all'1,5%.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Caratterizzazione fenotipica del ceppo Kp-1Pi

L'analisi fenotipica del profilo di resistenza del ceppo Kp-1Pi, effettuata tramite microdiluizione in brodo, ha dato i seguenti risultati per quanto riguarda i valori di Minima Concentrazione Inibente (MIC) per le molecole testate:

Antibiotici	MIC
<i>Amikacina</i>	>32 (R)
<i>Amoxicillina/acido clavulanico</i>	>64/2(R)
<i>Cefepima</i>	>16 (R)
<i>Ceftazidima</i>	>64 (R)
<i>Ceftazidima/Avibactam</i>	>32 (R)
<i>Ceftolozane/Tazobactam</i>	>64/4 (R)
<i>Ceftriaxone</i>	>4 (R)
<i>Ciprofloxacina</i>	>1 (R)
<i>Colistina</i>	≤0,5 (S)
<i>Ertapenem</i>	>2 (R)
<i>Fosfomicina</i>	32 (S)
<i>Gentamicina</i>	>8 (R)
<i>Levofloxacina</i>	>8 (R)
<i>Meropenem</i>	64 (R)
<i>Piperacillina/Tazobactam</i>	>128/4 (R)
<i>Tigeciclina</i>	0,5 (S)
<i>Trimethoprim/Sulfametossazolo</i>	>8/152 (R)

Tabella 4. Risultati dell'antibiogramma eseguito in brododiluizione per il ceppo di *K. pneumoniae* Kp-1Pi

L'interpretazione dei valori di MIC secondo i breakpoints clinici EUCAST (v.11.0/2021) mostra come il ceppo sia caratterizzato da un fenotipo XDR (Extensively Drug Resistant), risultando resistente ad antibiotici appartenenti alle famiglie delle cefalosporine (cefepima, ceftazidima e ceftriaxone), dei carbapenemi (ertapenem, meropenem), dei fluorochinoloni (ciprofloxacina, levofloxacina), degli aminoglicosidi (amikacina e gentamicina), a varie combinazioni di antibiotici β -lattamici / inibitori β -lattamasi disponibili in commercio (amoxicillina/acido clavulanico; ceftazidima/avibatcam; ceftozolan /tazobactam; piperacillina/tazobactam) e ai sulfamidici (trimetoprim /sulfametossazolo). Colistina, fosfomicina e tigeciclina sono le uniche molecole ad essere attive nei confronti di *K. pneumoniae* Kp-1Pi.

4.2 Caratterizzazione genotipica del ceppo Kp-1Pi

L'analisi di sequenza effettuata mediante le piattaforme di sequenziamento Illumina / Nanopore ha permesso di ottenere il genoma completo del ceppo di *K. pneumoniae* Kp-1Pi, evidenziando la presenza di diversi supporti genetici in aggiunta alla molecola di cromosoma (Tabella 5).

Supporto genetico	Lunghezza (kb)	Nome elemento	Note
Cromosoma	5,371,570	-	
Plasmide	340,567	pKp-1pi_HIB-FIB	Plasmide famiglia HIB-FIB
	54,064	pKp-1pi_FIB	Plasmide famiglia FIB
	4167	pKp-1pi_ColE2	Plasmide famiglia ColE
Fago	112,868	vB_Kpn_1PI_ST147	Profago famiglia <i>Siphoviridae</i>

Tabella 5. Supporti genetici identificati nel genoma completo di *K. pneumoniae* Kp-1Pi

La caratterizzazione clonale ha permesso di categorizzare Kp-1Pi come membro appartenente al Sequence Type ST147, gruppo clonale segnalato come “High risk clone”, cioè clone ad alto rischio di panresistenza (resistenza a tutti gli antibiotici), caratterizzato per la prima volta agli inizi degli anni '90 e soggetto ad una elevata diffusione a partire dagli anni 2000 in seguito ad alcune mutazioni cromosomiche e all'acquisizione di plasmidi F e plasmidi R contenenti geni codificanti per carbapenemasi e ESBL (31). La caratterizzazione del mobiloma, invece, ha evidenziato la presenza di elementi appartenenti a tre famiglie plasmidiche differenti (Tabella 5). È stato inoltre individuato un profago appartenente alla famiglia *Siphoviridae*.

L'analisi di sequenza effettuata mediante la piattaforma di analisi Pathogenwatch ha permesso di valutare tutti gli elementi del resistoma del ceppo Kp-1Pi, ovvero l'insieme di tutti i geni di resistenza (R) agli antibiotici, associandoli ai rispettivi supporti genetici (Tabelle 6.1, 6.2 e 6.3)

Gene	Fenotipo di Resistenza
<i>bla_{SHV-11}</i>	β-lattamici (penicilline)
<i>OqxA</i>	Disinfettanti e amfenicoli
<i>OqxB</i>	Disinfettanti e amfenicoli
<i>fosA</i>	Fosfomicina

Tabella 6.1. Determinanti di R associati al Cromosoma del ceppo Kp-1Pi.

Secondo l'analisi effettuata, il ceppo presenta alcuni determinanti di resistenza a livello del cromosoma nei confronti delle penicilline (*bla_{SHV-11}*), dei disinfettanti e degli amfenicoli (*OqxA* e *OqxB*) e della fosfomicina (*fosA*). Questi determinanti, tuttavia, sono stati considerati non rilevanti ai fini della trasmissione ad altri ceppi in quanto normalmente associati ad una blanda resistenza e normalmente associati al cromosoma.

Il plasmide FIB è risultato caratterizzato dalla presenza di molteplici elementi di resistenza ai β-lattamici, inclusi i carbapenemi (*bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-1}* e *bla_{CTX-M-15}*), agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni (*aac(6')-Ib-cr*, *aph(3')-VI*), alla rifampicina (*arr-*

3), ai chinoloni (*qnrS1*), al fenicolo (*catB3*) e ai sulfamidici (*sul1*). Particolarmente degna di attenzione è risultata l'individuazione del gene *bla_{NDM-1}*, codificante un enzima in grado di degradare tutti i β -lattamici, inclusi i carbapenemi, ad eccezione dei soli monobattami. La sua presenza a livello plasmidico è un indicatore di rischio della sua trasmissibilità ad altri ceppi.

Gene	Fenotipo di resistenza
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Fluorochinoloni e amminoglicosidi
<i>aph(3')-VI</i>	Amminoglicosidi
<i>bla_{NDM-1}</i>	β -lattamici (carbapenemasi)
<i>bla_{OXA-1}</i>	β -lattamici (penicillinasi)
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	β -lattamici (ESBL)
<i>qacE</i>	Disinfettanti, composti ammonio quaternario
<i>catB3</i>	Fenicoli
<i>arr-3</i>	Rifampicina
<i>qnrS1</i>	Chinoloni
<i>sul1</i>	Sulfamidici

Tabella 6.2 Geni di R associati al plasmide FIB (*pKp-1pi_FIB*)

Per quanto riguarda il plasmide HIB-FIB, sono stati caratterizzati molteplici geni correlati con la resistenza agli amminoglicosidi (*aph(3')-Ia*, *armA*), ai β -lattamici (un'ulteriore copia del gene *bla_{CTX-M-15}*), ai macrolidi (*mph(E)*, *msr(E)*, *mph(A)*), ai sulfonamidi (*sul1*, *sul2*), al trimetopim (*dfrA5*) e ai disinfettanti (*qacE*).

Gene	Fenotipo di resistenza
<i>aph(3')-Ia</i>	Amminoglicosidi
<i>armA</i>	Amminoglicosidi
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	β-lattamici (ESBL)
<i>qacE</i>	Disinfettanti
<i>msr(E)</i>	Macrolidi, Lincosamidi e Streptogramina B
<i>mph(E)</i>	Macrolidi
<i>mph(A)</i>	Macrolidi
<i>dfrA5</i>	Trimetrophrim
<i>sul2</i>	Sulfonamidi
<i>sulI</i>	Sulfonamidi

Tabella 6.3 Geni di R associati al plasmide HIB-FIB (*pKp-1pi_HIB-FIB*)

Non sono stati caratterizzati geni di resistenza a livello del plasmide CoIE né a livello del profago.

I dati ottenuti da questa comparazione tra il database e quelli rilevati nel genoma di Kp-1Pi sono risultati coerenti con quanto osservato con i test fenotipici (antibiogramma): infatti si è notata la presenza di geni di resistenza che hanno giustificato il profilo di resistenza osservato nei confronti di gentamicina e amikacina, come ad esempio *armA*, il quale codifica per un enzima in grado di metilare l'RNA ribosomale 16S, rendendo la subunità 30S non riconoscibile da parte degli amminoglicosidi. La resistenza ai β-lattamici è risultata coerente con l'identificazione di geni come, ad esempio, *bla_{CTX-M-15}* (ESBL), e *bla_{NDM-1}* che è in grado di inattivare efficacemente anche i carbapenemi.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dei geni di virulenza si sono ottenuti i seguenti risultati (*Tabelle 7.1 e 7.2*)

Gene	Fenotipo
<i>entA</i>	23-diidrossibenzoato-23-deidrogenasi
<i>entB</i>	23-diidro-23-diidrossibenzoato sintetasi isochroismatasi
<i>entC</i>	isocorismato sintasi
<i>entD</i>	enterochelina sintetasi component D
<i>entE</i>	enterobactina sintasi subunità E
<i>entF</i>	enterobactina sintasi subunità F
<i>fepA</i>	recettore della membrana esterna FepA
<i>fepB</i>	proteina legante periplasmatica trasportatore ferro-enterobactina
<i>fepC</i>	proteina legante l'ATP trasportatore del ferro-enterobactina
<i>fepD</i>	proteina di membrana trasportatrice ferro-enterobactina
<i>fepG</i>	trasportatore di ferro-enterobactina permease
<i>fes</i>	enterobactina/enterobactina esterasi ferrica
<i>fyuA</i>	recettore yersiniabactin FyuA
<i>iroE</i>	sideroforo esterasi IroE
<i>irp1</i>	yersiniabactina polichetide sintasi HMWP1
<i>ybdA</i>	enterobactina esportatore EntS
<i>ybtA</i>	yersiniabactina regolatore trascrizionale YbtA
<i>ybtE</i>	yersiniabactina biosintesi salicyl-AMP ligasi YbtE
<i>ybtP</i>	yersiniabactin ABC trasportatore ATP-binding/permeasi YbtP
<i>ybtQ</i>	yersiniabactin ABC trasportatore ATP-binding/permeasi YbtQ
<i>ybtS</i>	yersiniabactina biosintesi salicilato sintasi YbtS
<i>ybtT</i>	tioesterasi di tipo II YbtT
<i>ybtU</i>	yersiniabactina biosintesi ossidoreduttasi YbtU
<i>ybtX</i>	trasportatore MFS di zinco associato a yersiniabactina YbtX
<i>ybdA</i>	enterobactina esportatore EntS

Tabella 7.1. Geni di virulenza associati al cromosoma di Kp-1pi

A livello cromosomico, sono stati individuati diversi fattori di virulenza associati al trasporto e all'assorbimento del ferro ovvero siderofori, come l'aerobactina e la yerisniabactina. Questi sono prodotti molto spesso dai batteri, ed hanno la funzione di aumentarne l'assorbimento di ferro a discapito dell'ospite, in quanto anche per quest'ultimo risulta essere un elemento fondamentale per la respirazione cellulare e la replicazione del DNA. I siderofori, quindi, favoriscono il batterio nella competizione per questa risorsa.

In associazione al plasmide HIB-FIB sono stati identificati geni di virulenza correlati con la sintesi di ulteriori siderofori, come l'aerobactina, e relativi recettori (coinvolti nell'assorbimento del ferro come ad esempio *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iutA*), regolatori del fenotipo capsulare mucoide (*rmpA*, *rmpA2*) e vari sistemi di trasporto per metaboliti, tra cui *peg-344*, gene tipicamente associato a ceppi ipervirulenti di *K. pneumoniae*.

Gene	Fenotipo
<i>iucA</i>	aerobactina sintetasi <i>iucA</i>
<i>iucB</i>	N-acetiltransferasi <i>iucB</i>
<i>iucC</i>	aerobactin siderophore biosynthesis protein <i>iucC</i>
<i>iucD</i>	lisina 6-monoossigenasi <i>iucD</i>
<i>iutA</i>	recettore ferrico dell'aerobactina <i>iutA</i>
<i>rmpACD</i>	regolatore del fenotipo mucoide <i>RmpA</i> ⁺ , <i>RmpC</i> , <i>RmpD</i>
<i>rmpA2</i>	regolatore del fenotipo mucoide <i>RmpA2</i>
<i>cobW</i>	proteina del metabolismo del ferro, <i>CobW</i>
<i>shiF</i>	sistema di trasporto di emina e lisina, <i>ShiF</i>
<i>peg-344</i>	superfamiglia dei trasportatori di metaboliti (DMT), <i>PagO</i>
<i>luxR</i>	DNA-binding response regulator, <i>LuxR</i>

Tabella 7.2 Geni di virulenza associati al plasmide *pKp-1pi_HIB-FIB*

Non sono stati caratterizzati determinanti di virulenza a livello del plasmide CoIE né a livello del profago.

È interessante notare come sul plasmide HIB-FIB, in aggiunta ai fattori di virulenza precedentemente descritti (*tabella 7.2*), siano stati indentificati geni di resistenza, rendendolo di fatto un “plasmide mosaico”, fenomeno descritto raramente in letteratura in ceppi di *K. pneumoniae* appartenenti al clone ST147. Questo fatto riveste un’importanza fondamentale, in quanto il trasferimento orizzontale di plasmidi come pKp-1pi HIB-FIB sarebbe in grado di mediare la diffusione simultanea di tratti di resistenza al trattamento farmacologico e di caratteristiche legate, potenzialmente, alla capacità di generare infezioni invasive.

4.3 Esperimento di coniugazione

Questo esperimento ha avuto come scopo quello di valutare la potenzialità di trasferimento dei caratteri di resistenza e virulenza associati al plasmide HIB-FIB di *K. pneumoniae* Kp-1Pi utilizzando come ricevente un ceppo di laboratorio, *Escherichia coli* 1R716.

L’esperimento ha seguito un doppio filo conduttore: la determinazione della frequenza di coniugazione, basandosi sulla conta di colonie di *E. coli* selezionate in terreno con CTX/SM (transconiuganti) e di Kp-1Pi donatore (selezionate in terreno con CTX) e in contemporanea le verifiche fenotipiche specifiche di avvenuto trasferimento per ciascun plasmide.

Per effettuare queste, è stato necessario allestire alcune serie di piastre con differenti criteri di selezione su cui sub-coltivare colonie cresciute su terreno con doppia selezione CTX/SM. Per il plasmide FIB, tenendo conto della presenza di NDM-1, i transconiuganti sono stati coltivati in terreno con doppia selezione MEM/CTX. Per il plasmide HIB-FIB mosaico invece sono state allestite piastre con doppia selezione AMK/CTX, basandosi sulla presenza del gene *armA*. Per evidenziare un eventuale trasferimento di entrambi i plasmidi sono state allestite piastre selettive con tutti e tre gli antibiotici

(AMK/CTX/SM). Si è ottenuta crescita di colonie osservabili solo nelle piastre con selezione AMK/CTX. Questa circostanza delinea inequivocabilmente il trasferimento di uno solo dei due plasmidi, ovvero il plasmide HIB-FIB.

La frequenza di coniugazione rilevata per HIB-FIB è stata $1,5 \times 10^{-6}$, in linea con i dati presenti in letteratura per questa famiglia di plasmidi (32).

4.4 Caratterizzazione molecolare dei transconiuganti

L'analisi in spettrometria di massa MALDI eseguita sui transconiuganti cresciuti in piastra CTX/SM ha confermato l'appartenenza alla specie *E. coli*.

Le analisi tramite PCR sono state eseguite per due motivazioni fondamentali: in primis è stata eseguita un'amplificazione utilizzando *random primer* (RAPD) su ceppo donatore, transconiugante e ceppo ricevente. Questa fase si è resa necessaria per verificare che i transconiuganti fossero geneticamente correlati al ceppo ricevente (*E. coli* 1R716) (Immagine 2):

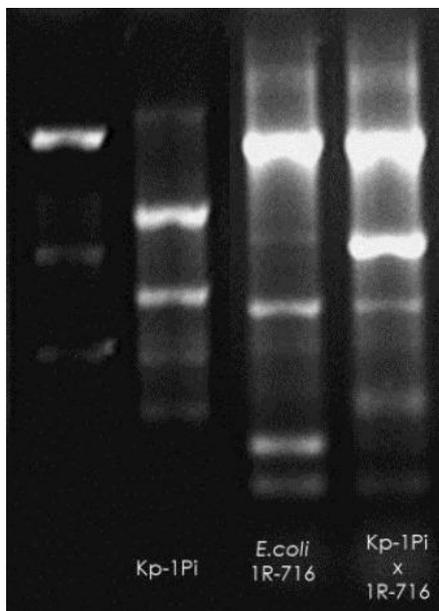


Immagine 2. Corsa elettroforetica RAPD

Come si può notare dall'immagine, i profili ottenuti per il ricevente e il transconiugante sono comparabili e si differenziano dal profilo evidenziato per *K. pneumoniae* Kp-1Pi.

Questo risultato dimostra che il ceppo di laboratorio *E. coli* 1R716 è stato effettivamente coinvolto nel processo di trasferimento.

In secundis sono state eseguite delle PCR gene-specifiche di conferma sui ceppi transconiuganti di *E. coli* 1R716 (n=10) cresciuti su piastre con doppia selezione CTX/SM. Uno di questi geni in particolare, *bla*_{CTX-M-15}, come già accennato in precedenza, è localizzato sia sul plasmide FIB sia sul plasmide FIB-HIB. In base a ciò, il risultato eventualmente positivo della PCR per *bla*_{CTX-M-15} testimonierebbe il passaggio di almeno uno dei due plasmidi, senza indicare con precisione se FIB, HIB-FIB o entrambi.

Considerando i dati di sequenziamento, che hanno mostrato la presenza del gene *bla*_{NDM-1} sul plasmide FIB, e la presenza del gene *armA* sul plasmide HIB-FIB, un'ulteriore serie di PCR specifiche è stata eseguita utilizzando questi due geni usati come "marker" molecolari per discriminare il trasferimento dei plasmidi FIB ed HIB-FIB. I risultati hanno mostrato come nei transconiuganti sottoposti a screening (n=10) fossero presenti solo i geni *bla*_{CTX-M-15} ed *armA*.

Questi fatti denotano ulteriormente che, nelle condizioni sperimentali adottate, è stato apprezzato il trasferimento di un solo elemento plasmidico, ossia il plasmide mosaico HIB-FIB.

	<i>bla</i> _{CTX-M 15}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>armA</i>
Transconiuganti	+	-	+

Tabella 8. Quadro riassuntivo dei risultati PCR per la ricerca di geni di resistenza specifici per il plasmide FIB (*bla*_{NDM}) ed FIB-HIB (*armA*)

Il plasmide mosaico, di cui è stato evidenziato il trasferimento *in vitro*, appartiene alla famiglia dei plasmidi HIB, spesso caratterizzati dalla presenza di geni codificanti funzioni di trasferimento (sintesi del pilo coniugativo) che mostrano un controllo della trascrizione temperatura-dipendente (33). Data l'efficienza ottimale a temperature comprese tra i 26 °C ed i 30 °C, si può supporre che i plasmidi di tipo HIB siano vettori in origine adattati a microrganismi diffusi a livello ambientale (colonizzatori di acque e suolo) dove, con temperature normalmente inferiori a quella corporea dell'uomo, questi elementi sarebbero in grado di mediare trasferimenti orizzontali con la massima efficienza. I

plasmidi della famiglia HIB, inoltre, sono elementi caratterizzati da uno spettro d'ospite estremamente elevato, che spazia tra Gram-negativi molto diversi agli enterobatteri, che spesso rivestono il ruolo di patogeni opportunisti per l'uomo. La presenza di un plasmide con queste caratteristiche in un isolato clinico costituisce un esempio molto evidente di come un elemento genetico canonicamente diffuso in ambiente possa mediare il trasferimento di fattori di resistenza e virulenza in ambito clinico.

5. CONCLUSIONI

L'analisi del genoma tramite WGS è ormai diventata la tecnica elettiva per la caratterizzazione genotipica di microrganismi MDR, perché fornisce accesso a tutto il corredo genetico di un microrganismo, con tempistiche molto più rapide rispetto alle metodologie convenzionali. Grazie a queste caratteristiche, il WGS risulta uno strumento fondamentale per il monitoraggio di focolai epidemici.

In questo lavoro di tesi, la caratterizzazione genotipica mediante sequenziamento ibrido con tecnologia Illumina e Nanopore ha permesso di caratterizzare il resistoma, l'intero contenuto dei geni coinvolti nei processi di resistenza agli antibiotici, il viruloma, l'intero contenuto di geni di virulenza, ed i rispettivi supporti genetici in un isolato clinico di *K. pneumoniae* multiresistente. Tale caratterizzazione ha permesso di evidenziare la presenza di fattori di virulenza non comuni associati ad un plasmide mosaico, in cui sono stati identificati anche geni di resistenza. Tale descrizione rappresenta uno scenario evolutivo allarmante, dovuto alla convergenza di tratti di virulenza e resistenza su uno stesso supporto genetico. In aggiunta, gli esperimenti di coniugazione hanno permesso di evidenziare la mobilitazione e l'efficienza di trasferimento di questo plasmide, aspetto

molto importante per comprendere i meccanismi molecolari alla base della diffusione dell'antibiotico-resistenza.

Questa esperienza, in definitiva, ha sottolineato l'importanza della caratterizzazione con metodiche molecolari avanzate, che rendere possibile l'individuazione di ceppi con caratteristiche non comuni. Per contrastare la diffusione dell'antibiotico-resistenza appare chiaro come sia assolutamente necessario destinare maggiori risorse in questo campo per poter formulare piani di prevenzione e di contrasto più efficaci.

Le prospettive in questo lavoro vedono necessari ulteriori approfondimenti relativi alla correlazione tra caratteristiche genotipiche e fenotipiche di ceppi MDR come quello studiato, attraverso l'utilizzo di modelli *in vivo* in cui è possibile studiare in modo più completo i meccanismi patogenetici alla base delle infezioni invasive sostenute da questi microrganismi.

L'ultima frontiera dell'indagine scientifica in questo ambito fa riferimento ad osservazioni sperimentali eseguite su modelli di organo in miniatura (organoidi), secondo il principio delle 3R (Reduction, Replacement and Refinement). In uno studio recente (34), ad esempio, alcuni ceppi di *K. pneumoniae* sono stati studiati in un modello di organoide per valutare la loro capacità di formare pori a livello della barriera intestinale; i risultati hanno permesso di comprendere come, a parità di viruloma, solo alcuni di essi causassero un danno. Ciò rimarca come l'analisi genotipica mediante tecniche molecolari, come ad esempio WGS, costituisca solo un primo livello di indagine che necessita di ulteriori conferme a livello fenotipico in specifici modelli *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- 1) World Health Organization (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. WHO, Geneva, Switzerland. ISBN 9789241564748
- 2) Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A. et al. (2016). *Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance*. *The Lancet, Antimicrobials: access and sustainable effectiveness*, volume 387, issue 10014
DOI: [10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- 3) Sara Hernando-Amado, Teresa M. Coque et al. (2019). *Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives*. *Nature Microbiology*, DOI: [10.1038/s41564-019-0503-9](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9)
- 4) N. Gupta, B. M. Limbago, J. B. Patel et al. (2011) «Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention». *Oxford Academic*,
DOI: [10.1093/cid/cir202](https://doi.org/10.1093/cid/cir202)
- 5) Van Boeckel, T. P. et al. (2017). *Reducing antimicrobial use in food animals*. *Science*. DOI: [10.1126/science.aao1495](https://doi.org/10.1126/science.aao1495)
- 6) Magdalena Zalewska, Aleksandra Błażejewska et al. (2021). *Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture*. *Frontiers in microbiology*,
DOI: [10.3389/fmicb.2021.610656](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656)
- 7) David M. P. De Oliveira, Brian M. Forde et al. (2020). *Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *American Society of Microbiology, clinical microbiology reviews*. DOI: [10.1128/CMR.00181-19](https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19)
- 8) ECDC, OECD. (2019). *Antimicrobial Resistance Tackling the Burden in the European Union*.
- 9) OECD (2018). *Stemming the Superbug Tide: Just a Few Dollars More*.
<https://doi.org/10.1787/9789264307599-en>
- 10) OECD (2015). *Antimicrobial Resistance in G7 countries and beyond: Economic Issues, Policies and Options for Action*.
- 11) Roberts (1996). *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution*. *Oxford Academic, FEMS Microbiology Reviews* DOI: [10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x)
- 12) Werckenthin et al. (2001). *Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine Staphylococcus aureus, porcine Staphylococcus hyicus, and canine Staphylococcus intermedius*. *EDP Science*.
DOI: [10.1051/vetres:2001129](https://doi.org/10.1051/vetres:2001129)
- 13) N Willetts, R Skurray (1980). *The conjugation system of F-like plasmids*. *Annual Reviews*. DOI: [10.1146/annurev.ge.14.120180.000353](https://doi.org/10.1146/annurev.ge.14.120180.000353)
- 14) G. G. Zhanel, R. Wiebe et al. (2007) *Comparative Review of the Carbapenems*. *Springer Link*. DOI: [10.2165/00003495-200767070-00006](https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006)
- 15) U.S. CDC (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*.

- 16) Robert F. Potter, Alaric W. D'Souza et al. (2016). *The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. *Science Direct, Drug Resistant Update*, DOI: [10.1016/j.drug.2016.09.002](https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.002)
- 17) Patricia Brañasa, Jennifer Villa et al. (2015) *Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone*. *International Journal of Antimicrobial Agents* DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019)
- 18) Emily M. Eichenberger and Joshua T. Thaden (2019). *Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria*. *MDP Open Access Journal*, DOI: [10.3390/antibiotics8020037](https://doi.org/10.3390/antibiotics8020037)
- 19) Tzouvelekis LS, Markogiannakis A et al. (2012) *Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions*. *Clin Microbiol Rev*. DOI: [10.1128/CMR.05035-11](https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11)
- 20) Mariana Castanheira, Lalitagauri M. et al. JMI Laboratories, North Liberty, Iowa; (2019) *Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. *Oxford Academic, Open Forum Infectious Diseases*. DOI: [10.1093/ofid/ofy347](https://doi.org/10.1093/ofid/ofy347)
- 21) Xiaopeng Li and Huan Ye (2017). *Clinical and Mortality Risk Factors in Bloodstream Infections with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*. *Hindawi; Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, DOI: [10.1155/2017/6212910](https://doi.org/10.1155/2017/6212910)
- 22) *European Centre for Disease Prevention and control*, (2017). *Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control*
- 23) Nordmann P, Poirel L et al. (2011). *The emerging NDM carbapenemases*. *Trends in microbiology*, DOI: [10.1016/j.tim.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005)
- 24) Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. (2009). *Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*. *American Society of Microbiology, Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, DOI: [10.1128/AAC.00774-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09)
- 25) Guducuoglu H, Gursoy NC et al. (2018). *Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- and OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, DOI: [10.1089/mdr.2017.0173](https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173)
- 26) Lara Tavoschi, Silvia Forni et al. (2020). *Prolonged outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase producing carbapenem-resistant Enterobacterales (NDM-CRE), Tuscany, Italy, 2018 to 2019*. *Eurosurveillance* DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000085](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000085)
- 27) Simone Iacchini, Fortunato “Paolo” D’Ancona et al. (2019); “CPE: sorveglianza nazionale delle batteriemie da enterobatteri produttori di carbapenemasi”. *Dati 2019*. Istituto superiore di Sanità

- 28) Thomas A Russo , Candace M Mar (2019). *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. *American Society of Microbiology, Clinical Microbiology Reviews*, DOI: [10.1128/CMR.00001-19](https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19)
- 29) Thomas A. Russo, Alyssa S. Shon, et al. (2011). *Hypervirulent K. Pneumoniae Secretes More and More Active Iron-Acquisition Molecules than “Classical” K. Pneumoniae Thereby Enhancing its Virulence*. *PLoS One*, DOI: [10.1371/journal.pone.0026734](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026734)
- 30) Chen L and Kreiswirth BN (2018). *Convergence of carbapenem-resistance and hypervirulence in Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet, Infectious Diseases*, DOI: [10.1016/S1473-3099\(17\)30517-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30517-0)
- 31) Gisele Peirano , Liang Chen et al., (2020). *Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk Klebsiella pneumoniae Clones ST307 and ST147*. *American Society for Microbiology, Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, DOI: [10.1128/AAC.01148-20](https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20)
- 32) Timothy R. Walsh, Janis Weeks et al. (2011). *Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study*. *The Lancet, Infectious Diseases*, DOI: [10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
- 33) Núria Forns, Rosa C Baños et al. (2005). *Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome – and plasmid – encoded Hha and H-NS proteins*. *American Society for Microbiology, Journal of Bacteriology* DOI: [10.1128/JB.187.12.3950-3959.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.12.3950-3959.2005)
- 34) Nobuhiro Nakamoto, Nobuo Sasaki et al.(2019). *Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis*. *Nature Microbiology*, DOI: [10.1038/s41564-018-0333-1](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0333-1)