



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE**

**“VINCENZO TIBERIO”**

Dottorato di Ricerca in  
*“Medicina Traslazionale e Clinica”*  
Ciclo XXXII

TESI DI DOTTORATO

**Genomica in Sanità Pubblica:  
integrazione tra dati molecolari e sorveglianza epidemiologica  
per la prevenzione e il controllo delle infezioni sostenute da  
batteri  
patogeni multi-resistenti**

Tutor  
*Chiar.mo Prof. Giancarlo Ripabelli*

Coordinatore  
*Chiar.mo Prof. Marco Sarchiapone*

Dottoranda  
*Domiziana Di Tella*

## ABSTRACT

L'antibiotico-resistenza (AMR) è un problema diffuso a livello globale. Tra i patogeni che mostrano spiccata multi-resistenza (MDR) sono rilevanti *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* responsabili di infezioni correlate all'assistenza e *Salmonella enterica* non tifoidea di quelle a trasmissione alimentare.

Obiettivo principale del lavoro è stato quello di descrivere le caratteristiche epidemiologiche di AMR relative a tali patogeni caratterizzando, con diversi approcci molecolari, ceppi di *K. pneumoniae* e *A. baumannii* isolati nell'ambito del sistema di sorveglianza 'Alert organisms' presso il Presidio Ospedaliero (PO) 'A. Cardarelli' di Campobasso (Regione Molise) e ceppi di *S. enterica* non tifoidea raccolti nelle attività di ispezione del Public Health England, Regno Unito.

Sono stati analizzati 26 ceppi di *K. pneumoniae* e 24 di *A. baumannii* per valutare, mediante antibiogramma, il profilo di resistenza (resistotipo) a diversi antibiotici e, mediante PCR, la prevalenza di determinanti di AMR (KPC, GES, VIM, IMP, NDM, OXA-48, CTX-M, TEM, SHV; GIM, AmpC, OXA-23/24/51/58 solo in *A. baumannii*, come *adeB/J/G/S/M*, *soxR* e *craA* codificanti per sistemi di efflusso. Nei ceppi di *K. pneumoniae* colistina-resistenti è stata effettuata la ricerca di varianti *mcr*(1-8) e di mutazioni in *mgrB* mediante sequenziamento. La tipizzazione molecolare è stata condotta mediante Pulsed field gel electrophoresis (PFGE), con *XbaI* per *K. pneumoniae* e *ApaI/AscI* per *A. baumannii*, e Multilocus sequence typing (MLST), usando rispettivamente i protocolli Pasteur e Oxford. Sono stati analizzati i dati ottenuti mediante Whole genome sequencing (WGS) relativi a 74.958 campioni di diversa origine (alimenti, mangimi, acqua, ambiente) raccolti nel periodo 2013-18 per determinare la prevalenza di *S. enterica* non tifoidea e dei serovar e di geni di AMR nei soli ceppi provenienti da Regno Unito, Tailandia e Brasile.

Nei ceppi MDR di *K. pneumoniae*, è stata confermata la presenza di KPC a livello endemico e l'elevata diffusione di VIM, TEM e SHV, implicati nella resistenza ai carbapenemi, mentre la resistenza alla colistina (70%) è stata attribuita alla sola presenza di mutazioni puntiformi e inserzioni di sequenza (*IS5like*, *ISKpn14*) in *mgrB*. PFGE e MLST hanno identificato rispettivamente un cluster epidemico verificatosi nel reparto di terapia intensiva del PO e una maggiore prevalenza del sequence type (ST) 512 seguito da ST101, in linea con dati nazionali.

In tutti i ceppi MDR di *A. baumannii*, è stata osservata la presenza di OXA-23 e OXA-51, in linea con molti studi italiani e nel 30% anche VIM, tipicamente riscontrata in *K. pneumoniae*. I geni codificanti per le pompe di efflusso sono stati individuati in tutti i ceppi, tranne *abeM* e *craA* risultati assenti. La PFGE ha raggruppato i ceppi in cluster, mentre ST1720 è risultato il clone prevalente, sebbene non riscontrato in altri studi italiani.

La prevalenza di *S. enterica* non tifoidea è stata pari all'1,3% e più elevata in campioni di pollo e foglie di *betel*. *S. Heidelberg* è risultato il *serovar* maggiormente coinvolto nella diffusione di geni di AMR, in accordo con evidenze in letteratura. L'analisi di determinanti di AMR ha riguardato 384 ceppi includendo quelli da Brasile, Tailandia e Regno Unito. Gli isolati da Brasile hanno mostrato un'elevata MDR (a più di 3 classi di antibiotici), dovuta alla presenza di *aac(6')-Iy* (100%), *parC* (97,2%), *tet(A)-1* (94,6%), *sul-2* (94,2%) e *CMY-2* (75%), associati rispettivamente alla resistenza verso aminoglicosidi, fluorochinoloni, tetracicline, sulfametossazolo e  $\beta$ -lattamici. Anche i ceppi provenienti da Tailandia hanno mostrato livelli elevati di AMR presentando soprattutto *parC* (59%) e *aac(6')-Iy* (56%). Negli isolati da Regno Unito è stato riscontrato il livello di AMR più basso e *parC* (70%) e *aac(6')-Iy* (68,8%) sono stati prevalenti. La differente prevalenza di geni di resistenza è plausibilmente associata a diverse strategie per contrastare il fenomeno dell'AMR nel Regno Unito e in Tailandia, mentre sono ancora assenti in Brasile.

# INDICE

<b>1. Premessa</b>	<b>1</b>
<b>2. Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>2.1. L'antibiotico-resistenza</b>	<b>3</b>
<b>2.2. L'approccio 'One Health'</b>	<b>7</b>
2.2.1. Uso di antimicrobici nell'uomo, in animali e nelle piante	7
2.2.2. Impatto dell'antibiotico-resistenza	9
<b>2.3. La <i>stewardship</i> antimicrobica</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)</b>	<b>14</b>
<b>2.5. I microrganismi 'ESKAPE'</b>	<b>16</b>
2.5.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.5.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
2.5.3. Meccanismi di resistenza nei patogeni 'ESKAPE'	20
2.5.3.1. I beta-lattamici	22
2.5.3.2. I carbapenemi	24
2.5.3.3. Meccanismi di resistenza	26
2.5.3.3.1. $\beta$ -lattamasi	28
2.5.3.3.2. $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL)	28
2.5.3.3.3. AmpC $\beta$ -lattamasi	29
2.5.3.3.4. Carbapenemasi	31
2.5.3.3.5. Pompe di efflusso	36
2.5.3.4. La colistina	39
2.5.3.4.1. Resistenza alla colistina	40

<b>2.6. Alimenti e antibiotico-resistenza</b>	<b>43</b>
2.6.1. <i>Salmonella enterica</i> non tifoidea	44
<b>2.7. Genomica in Sanità Pubblica</b>	<b>46</b>
2.7.1. La genotipizzazione degli isolati batterici	47
2.7.1.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	47
2.7.1.2. MultiLocus Sequence Typing (MLST)	50
2.7.1.3. Whole Genome Sequencing (WGS)	51
<b>3. Obiettivi</b>	<b>52</b>
<b>4. Materiali e metodi</b>	<b>55</b>
<b>4.1. La resistenza agli antibiotici nel contesto ospedaliero</b>	<b>55</b>
4.1.1. Isolamento e selezione di ceppi di <i>K. pneumoniae</i> e <i>A. baumannii</i>	55
4.1.2. Test di suscettibilità agli antibiotici	58
4.1.3. Estrazione del DNA	60
4.1.4. Ricerca di geni implicati nella resistenza ai carbapenemi	61
4.1.5. Caratterizzazione molecolare della resistenza alla colistina in <i>K. pneumoniae</i>	65
4.1.6. Protocolli di PFGE	68
4.1.7. Protocolli di MLST	69
<b>4.2. <i>S. enterica</i> non tifoidea a trasmissione alimentare e antibiotico-resistenza</b>	<b>71</b>
4.2.1. Analisi di un database relativo a campioni di diversa origine per valutare la prevalenza di <i>Salmonella</i> spp.	72
4.2.2. Analisi dei campioni risultati positivi per <i>S. enterica</i> non tifoidea	75
4.2.3. Analisi dei determinanti di resistenza ottenuti mediante WGS in ceppi di <i>S. enterica</i> non tifoidea provenienti da tre aree geografiche	76
<b>5. Risultati</b>	<b>77</b>
<b>5.1. <i>K. pneumoniae</i></b>	<b>77</b>
5.1.1. Profili di antibiotico-resistenza	77

5.1.2. Prevalenza dei geni di resistenza	79
5.1.3. Prevalenza delle varianti <i>mcr</i> coinvolte nella resistenza alla colistina e analisi del gene <i>mgrB</i>	80
5.1.4. Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLST	85
<b>5.2. <i>A. baumannii</i></b>	<b>87</b>
5.2.1. Profili di antibiotico-resistenza	87
5.2.2. Prevalenza dei geni di resistenza	89
5.2.3. Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLST	90
<b>5.3. <i>S. enterica</i> non tifoidea</b>	<b>96</b>
5.3.1. Analisi di campioni di diversa origine	96
5.3.2. Analisi dei campioni positivi per <i>S. enterica</i> non tifoidea	98
5.3.3. Prevalenza dei determinanti di resistenza valutati mediante WGS	106
<b>6. Discussione</b>	<b>114</b>
<b>6.1. Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di <i>K. pneumoniae</i></b>	<b>114</b>
<b>6.2. Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di <i>A. baumannii</i></b>	<b>122</b>
<b>6.3. Determinanti di resistenza agli antibiotici in <i>S. enterica</i> non tifoidea in campioni di diversa matrice</b>	<b>130</b>
<b>7. Conclusioni</b>	<b>139</b>
<b>8. Bibliografia</b>	<b>147</b>

## 1. Premessa

L'antibiotico-resistenza (AMR) rappresenta un'allarmante priorità di Sanità Pubblica, sia per le importanti implicazioni cliniche (aumento della morbilità, letalità, durata della malattia, sviluppo di complicanze, epidemie), sia per le conseguenze economiche che ne derivano in ambito sanitario. L'emergenza e la diffusione di batteri multiresistenti agli antibiotici limita drasticamente le opzioni terapeutiche. In Italia, la situazione è preoccupante, soprattutto a causa di batteri Gram-negativi, come *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, frequentemente isolati nel *setting* ospedaliero e, in particolare, nei reparti di terapia intensiva, che mostrano resistenza anche agli antibiotici di ultima linea come i carbapenemi, fino a portare alla riconsiderazione e al riutilizzo di antibiotici di vecchia generazione, come la colistina.

L'antibiotico-resistenza, essendo un fenomeno globale, che riguarda tutte le componenti della vita, interessa anche gli alimenti e i patogeni a trasmissione alimentare come *Salmonella enterica*, le cui varianti non tifoidee sono la principale causa di infezioni gastroenteriche nei Paesi industrializzati. Tali infezioni, perlopiù auto-limitanti, talvolta necessitano di un trattamento antibiotico, che può avere opzioni limitate a causa di ceppi resistenti. L'emergenza della resistenza in batteri zoonotici come *Salmonella* non tifoidea non dipende da un errato uso di antibiotici nell'uomo a scopi terapeutici, ma principalmente da un eccessivo uso, spesso in dosi sub-terapeutiche, in ambito zootecnico. Quindi, l'antibiotico-resistenza è un fenomeno che riguarda l'intera biosfera, quindi, l'uomo, gli animali, le piante e l'ambiente e può essere contrastato solo con un approccio olistico al problema e con una visione di insieme denominata '*One Health*'.

Per fare fronte a questo problema sempre più emergente, in Italia, il Ministero della Salute ha emanato il Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020, che sottolinea il ruolo importante della sorveglianza epidemiologica e i cui effetti potranno essere valutati nel tempo. In tale contesto, si colloca il presente lavoro di tesi, che, grazie all'utilizzo di tecniche di genomica,

contribuisce alla raccolta e analisi di dati epidemiologici sul tema dell'antibiotico-resistenza, anche in confronto alle statistiche nazionali e internazionali. In dettaglio, il lavoro ha riguardato lo studio di *K. pneumoniae* e *A. baumannii* isolati nel *setting* ospedaliero nella Regione Molise e di *Salmonella enterica* non tifoidea isolati a seguito dei controlli igienico-sanitari effettuati nel Regno Unito e provenienti da diverse matrici (alimenti, ambiente, acqua) e da diverse regioni geografiche del mondo.



## 2. Introduzione

### 2.1. L'antibiotico-resistenza

Dal 1928, anno in cui Alexander Fleming scoprì la penicillina, gli agenti antimicrobici hanno rivoluzionato la medicina moderna e sono diventati essenziali nel garantire la salute dell'uomo e degli animali. A causa della loro estrema efficacia e facilità di acquisto, l'utilizzo che è stato purtroppo eccessivo e spesso errato. Lo stesso Fleming, durante la cerimonia in cui gli venne consegnato il premio Nobel, nel 1945, avvertì il mondo scientifico della possibile insorgenza della resistenza se la penicillina fosse stata utilizzata in maniera inappropriata, non necessaria e soprattutto a basso dosaggio (Nhung NT et al., 2017). Ciò non ha tardato ad accadere, tanto che nel XXI secolo il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è diventato un grave problema di salute pubblica a livello globale (Prestinaci F et al., 2015; Thanner S et al., 2016; Naylor N et al., 2018; Florez-Cuadrado D et al., 2018), che ha determinato una profonda crisi nell'efficacia dei trattamenti terapeutici, anche di infezioni batteriche semplici (McEwen S, Collignon PJ, 2018). Le proiezioni dell'impatto dell'AMR per l'anno 2050 prevedono uno scenario catastrofico. Le infezioni sostenute da patogeni resistenti agli antibiotici saranno, infatti, la prima causa di morte, determinando 10 milioni di decessi ogni anno, più di quelle causate dal cancro oggi che ammontano a 8,2 milioni (O'Neill J, 2016). Molti agenti infettivi potrebbero essere sconfitti con successo utilizzando una delle classi di antibiotici disponibili, ma hanno raggiunto livelli elevati di resistenza, virtualmente a tutte le classi esistenti (McEwen S, Collignon PJ, 2018).

L'uso eccessivo di antibiotici in molteplici settori (umano, veterinario, agricolo e zootecnico) sono la prima causa di tale problema, ma anche quello inappropriato, in termini di scelta inadeguata, dosaggio inadatto e scarsa aderenza alle linee guida per il trattamento (McEwen S, Collignon PJ, 2018; Prestinaci F et al., 2015), insieme a numerosi fattori biologici (evoluzione batterica), comportamentali

(autoprescrizione, automedicazione), economici (import-export di cibo), ambientali (inquinamento) e sociali (viaggi internazionali e intercontinentali), che contribuiscono alla diffusione della resistenza antimicrobica (Littmann J, Viens A, 2015).

L'AMR è un fenomeno naturale che si può verificare quando i microrganismi sono esposti ai farmaci. Sotto la pressione selettiva degli antibiotici, i batteri sensibili vengono uccisi o inibiti, mentre i batteri che sono naturalmente o intrinsecamente resistenti o che hanno acquisito caratteristiche di resistenza hanno maggiori possibilità di sopravvivere e moltiplicarsi, nonché di essere selezionati (Prestinaci F et al., 2015). Lo sviluppo della resistenza può essere il risultato di mutazioni spontanee o dell'acquisizione di geni di resistenza mediante trasferimento genico orizzontale, come coniugazione, trasformazione e trasduzione (Blair JM et al., 2015; Elbashir AS et al., 2018; Florez-Cuadrado D et al., 2018). Questi trasferimenti possono avvenire nel suolo e nell'acqua, ma anche nel sistema digestivo di esseri umani e animali, nonché negli alimenti (Blair JM et al., 2015; Elbashir et AS al., 2018; Florez-Cuadrado D et al., 2018).

Negli USA, l'utilizzo degli antibiotici venne introdotto nella pratica dell'allevamento durante il boom economico avvenuto dopo la seconda guerra mondiale al fine di sopperire alla richiesta di carne. Tale pratica si è presto diffusa in tutto il mondo in quanto consentiva una produzione molto elevata di carne (Kahn LH, 2017). L'uso di molti antibiotici nella produzione animale, in dosi sub-terapeutiche e con lunghi periodi di esposizione, crea le condizioni ideali per la fissazione dei geni che conferiscono resistenza, che possono essere, successivamente, trasmessi ad agenti patogeni umani o al microbiota intestinale umano attraverso cibo contaminato o attraverso l'ambiente (Robinson TP et al., 2016). Gli antimicrobici sono utilizzati anche nella protezione delle piante e nell'acquacoltura (Stockwell VO et al., 2012; Robinson TP et al., 2016). È da sottolineare che questi fattori sono esacerbati nei Paesi in via di sviluppo caratterizzati da una legislazione permissiva. L'India, ad esempio, è tra i maggiori consumatori di antibiotici umani al mondo (Farooqui HH et al., 2018), spesso prescritti dai medici di medicina generale in modo errato, contribuendo alla pressione selettiva sui patogeni umani. Inoltre, in questi Paesi, l'uso di materiale fecale di origine animale per la

concimazione del terreno agricolo è piuttosto frequente e contribuisce alla diffusione dei geni di resistenza, veicolati da cibo e falde acquifere (Verraes C et al., 2013). Gli alimenti possono essere contaminati da batteri resistenti e/o che acquisiscono geni di resistenza agli antimicrobici in altri modi; ad esempio, prodotti animali possono contenere batteri resistenti a causa di una contaminazione fecale avvenuta durante la macellazione (Florez-Cuadrado D et al., 2018). Gli alimenti possono anche essere soggetti a contaminazione crociata dall'ambiente o dopo la trasformazione o da altri alimenti durante la manipolazione da parte del consumatore (Verraes C et al., 2013). Alcuni prodotti alimentari possono essere ingeriti senza alcun trattamento di trasformazione (cottura) o conservazione (verdure fresche, frutta e latte crudo) e possono contenere cellule batteriche vive e vitali al momento dell'ingestione. Tutto ciò può comportare un alto rischio di trasferimento di geni.

Attraverso il processo di selezione darwiniano, quindi, i microrganismi hanno sviluppato meccanismi robusti per sfuggire a molte sostanze tossiche (Holmes AH et al., 2015). La maggior parte degli antimicrobici sono prodotti naturalmente da microrganismi, tra cui funghi e batteri saprofiti, o sono derivati da modificazioni artificiali di essi; solo pochi farmaci sono interamente sintetici (sulfamidici e fluorochinoloni) (Holmes AH et al., 2015). I meccanismi protettivi che i microrganismi acquisiscono o mettono in atto includono la prevenzione dell'ingresso o l'estrusione della sostanza e la produzione di enzimi che distruggono o modificano l'antimicrobico inattivandolo. Pertanto, l'AMR potrebbe essere considerata semplicemente come la lotta darwiniana tra la sostanza antimicrobica naturale e i microrganismi. Studi di meta-genomica funzionale di microrganismi del suolo hanno mostrato un'ampia diversità dei determinanti genetici alla base dell'AMR, ma la frazione realmente conosciuta e studiata è quella che interessa i patogeni umani e gli antibiotici di uso comune (Forsberg K et al., 2014). Un esempio è caratterizzato dalle  $\beta$ -lattamasi, enzimi che inattivano i  $\beta$ -lattamici, che esistono da milioni di anni, sviluppati come un naturale meccanismo di resistenza dei batteri del suolo, che poi si è diffuso al comparto umano (Aminov RI, 2009). In origine, si riteneva che la produzione di molecole antimicrobiche da parte di ogni microrganismo servisse a “difendere

il territorio” inibendo la crescita di microorganismi vicini, fornendo un vantaggio competitivo nell'ambiente locale, ma alcuni studi suggeriscono un'interazione più complessa.

La concentrazione di molecole antimicrobiche nel suolo sembra essere, infatti, troppo bassa per inibire la crescita di altri batteri; in secondo luogo, concentrazioni sub-letali degli antimicrobici hanno effetti sostanziali sulla fisiologia dei batteri, aumentando il tasso di evoluzione microbica adattiva e possibilmente fungendo da molecole di segnalazione (Andersson D, 2014). Per alcuni batteri saprofiti che producono carbapenemi, ad esempio, i geni implicati nella sintesi di tali antibiotici potrebbero anche avere un ruolo nel ‘*quorum-sensing*’, cioè un sistema di regolazione trascrizionale dipendente dalla densità cellulare attraverso il quale una colonia microbica coordina la crescita e l'espressione genica, oppure nella formazione di biofilm (Holmes AH et al., 2015).

## 2.2. L'approccio 'One Health'

Nel 2001, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha descritto l'AMR come un problema globale che richiede una risposta globale (WHO, 2001).

L'approccio "One Health", definito dall'American Veterinary Medical Association nel 2008 come *'[...] lo sforzo collaborativo di più discipline – che lavorano a livello locale, nazionale e globale - per raggiungere una salute ottimale per le persone, gli animali e l'ambiente [...]'*, ritiene che la salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente sia collegata come quella di un organismo unico. Oltre ad essere un problema di 'One Health', l'AMR è un problema di 'One World' a causa della globalizzazione del sistema di approvvigionamento alimentare, con un crescente movimento di bestiame e prodotti agricoli, combinato con un aumento dei viaggi internazionali ed intercontinentali, che facilita la rapida diffusione e la combinazione/associazione di geni di AMR emergenti (Robinson TP et al., 2016). Le aree di lavoro in cui un approccio 'One Health' è particolarmente rilevante includono la sicurezza alimentare, il controllo delle zoonosi, ovvero malattie che possono trasmettersi da animali all'uomo (salmonellosi non tifoidee) e la lotta alla resistenza agli antibiotici (World Health Organization, 2019; CDC, 2019).

### 2.2.1. Uso di antimicrobici nell'uomo, in animali e nelle piante

Per fronteggiare il problema dell'AMR, è necessario limitare il più possibile l'uso degli antibiotici al fine di preservarne l'efficacia (Littmann J et al., 2015); tuttavia, in molte regioni del mondo, non è ancora garantito un accesso adeguato agli antibiotici ed il costo dei farmaci è spesso proibitivo (Laxminarayan R et al., 2013). Allo stesso tempo, la metà della produzione mondiale di antibiotici viene ancora utilizzata nell'allevamento di animali e specie ittiche, contribuendo a selezionare

serbatoi di batteri resistenti e ad aggravare ulteriormente il problema (Bengtsson B, Greko C, 2014; European Medicines Agency, 2014).

Alcune classi di sostanze antimicrobiche sono riservate più o meno esclusivamente all'uomo, in particolare quelle utilizzate per il trattamento della tubercolosi (isoniazide) o altre infezioni per le quali gli animali non sono in genere trattati (bovini con tubercolosi bovina, generalmente distrutti anziché trattati), altri, invece, sono limitati all'uso veterinario (flavofosfolipoli, ionofori), principalmente a causa della tossicità per l'uomo. Tuttavia, la maggioranza delle classi antimicrobiche viene utilizzata sia nell'uomo sia negli animali, compresi quelli domestici, uccelli, pesci e crostacei d'allevamento e api (Van Boeckel TP et al., 2015; European Medicines Agency, 2016; Food and Agriculture Organization, 2016). Nell'orticoltura, per il trattamento e la profilassi delle infezioni batteriche di frutta, come mele e pere sono talvolta utilizzate le tetracicline, la streptomina e altri antimicrobici (Vidaver AK, 2002). Nell'uomo, gli antimicrobici sono usati principalmente per il trattamento delle infezioni, ma esiste anche un limitato uso profilattico (post-chirurgia) o nei gruppi maggiormente a rischio di infezione durante eventi epidemici (prevenzione della malattia meningococcica). Nella medicina veterinaria, specialmente negli animali, le pratiche di uso antimicrobico sono sostanzialmente simili a quelle nell'uomo (Sykes JE, 2013; Giguère S et al 2013). Nel caso di animali destinati al consumo umano, invece, l'uso 'terapeutico' prevede la somministrazione del farmaco all'intero gruppo, anche quando solo alcuni animali sono clinicamente infetti. L'uso 'profilattico' avviene quando non sono presenti animali malati, ma sono ad alto rischio di infezione batterica clinica a causa dell'esposizione ad agenti infettivi (miscelezioni di animali di diversa provenienza), scarse condizioni igienico-sanitarie o altri fattori (età, stress del trasporto) (McEwen S, Collignon PJ, 2018). La profilassi antimicrobica in gruppi di persone è rara ed è generalmente limitata alla gestione di infezioni gravi e altamente trasmissibili come la malattia meningococcica. Il tipo più controverso di trattamento di gruppo negli animali da consumo è la somministrazione di antibiotici di massa a basso dosaggio e a lungo termine ai fini della promozione della crescita, in quanto tali molecole hanno la capacità di modificare parzialmente il metabolismo

animale, aumentando la capacità di convertire il mangime in massa corporea (Zuraw L, 2014). L'OMS ha sostenuto la cessazione dell'uso di antimicrobici a tale scopo (O'Neill J, 2016). Questa pratica è stata vietata in Europa e altrove e progressivamente eliminata (European Union (EU), 2015/C 299/04).

### **2.2.2. L'impatto dell'antibiotico-resistenza**

L'impatto dell'AMR in termini di mortalità e costi sanitari è abbastanza difficile da stimare. Secondo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) degli Stati Uniti più di 2 milioni di persone sono affette ogni anno da infezioni sostenute da batteri resistenti agli antibiotici e di questi circa 23.000 muoiono a causa di esse (CDC, 2013). L'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ha stimato che in Europa, ogni anno, il numero di infezioni e decessi dovuti a batteri multiresistenti (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) sia rispettivamente pari a 400.000 e 25.000 (ECDC/EMA, 2009). È stato, inoltre, stimato che il carico economico complessivo della resistenza agli antibiotici sia di almeno 1,5 miliardi di euro, con oltre 900 milioni di euro di costi ospedalieri (ECDC/EMA, 2009). L'OMS ha da tempo riconosciuto la necessità di uno sforzo globale coordinato per contenere l'AMR. Nel 2001, la strategia globale ha fornito un quadro di interventi per rallentare l'emergenza e ridurre la diffusione di microrganismi resistenti agli antimicrobici (World Health Organization, 2001). Nel 2012, l'OMS ha pubblicato 'The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance-Option for Action' (World Health Organization, 2012; Prestinaci F et al., 2015) che propone una combinazione di interventi che includono il rafforzamento dei sistemi sanitari e la sorveglianza; il miglioramento dell'uso degli antimicrobici nel contesto ospedaliero e nelle comunità; la prevenzione e il controllo delle infezioni; lo sviluppo di nuovi farmaci e vaccini adeguati e l'impegno politico. Nell'aprile 2014, l'OMS ha pubblicato il primo report globale sulla sorveglianza

della resistenza antimicrobica in cui sono stati riportati i dati trasmessi da reti di sorveglianza nazionali e internazionali (World Health Organization, 2014) ed utilizzati per orientare sia le scelte terapeutiche, sia per comprendere le tendenze dell'AMR, per identificare le aree prioritarie per gli interventi e per effettuare il monitoraggio dell'impatto degli interventi sul contenimento. La mancanza di un'adeguata sorveglianza in molte parti del mondo lascia grandi lacune nella conoscenza complessiva della distribuzione e della portata di questo fenomeno.



### 2.3. La *stewardship* antimicrobica

Gli antibiotici sono farmaci unici che presentano un impatto 'ecologico' notevole, in cui la prescrizione a un singolo paziente può influenzare lo stato di colonizzazione/infezione di molti altri (Menichetti F et al., 2018). Poiché le proiezioni riguardo l'AMR, parzialmente causata da un eccessivo uso degli antibiotici, non sono ottimistiche, la prescrizione di antibiotici dovrebbe basarsi su un processo razionale, valutando le informazioni epidemiologiche, microbiologiche, cliniche e farmacologiche disponibili. In Italia, la situazione è particolarmente difficile, poiché la resistenza ai carbapenemi da parte di *Enterobacteriaceae* e batteri Gram-negativi non fermentanti ha raggiunto valori iper-endemici (Rapporti ISTISAN 17-18).

Il termine '*antimicrobial stewardship*' si incontra in diversificati contesti, dai programmi di gestione antimicrobica negli ospedali e nella comunità, in ambito veterinario, nell'approccio '*One Health*' e nel quadro di amministrazione globale dell'OMS (Dyar O et al., 2017). Il primo articolo in cui si fa riferimento all '*antimicrobial stewardship*' è stato pubblicato negli Stati Uniti nel 1996 da John E. McGowan Jr e Dale N. Gerding, i quali hanno posto l'accento sul concetto che gli antimicrobici sono una preziosa risorsa non rinnovabile; il termine prevedeva la prescrizione appropriata degli antimicrobici, evitandone un uso inutile, anche se in quel periodo l'obiettivo esclusivo era il contenimento dei costi (Dyar O et al., 2017).

Molto spesso il termine si concentra solo sulle prescrizioni mediche, ma sta via via assumendo il concetto di strategia, ovvero una serie di azioni coerenti che promuovono l'uso responsabile degli antibiotici. Le azioni specifiche variano a seconda dello *stakeholder*, ma condividono molti punti in comune a diversi livelli all'interno di un sistema sanitario, nonché tra salute umana e animale.

Secondo il PNCAR 2017-2020 per contrastare efficacemente il fenomeno dell'AMR sono necessari interventi sui diversi settori interessati dal fenomeno, in grado di promuovere l'interazione e il coordinamento efficace delle azioni ai diversi livelli (nazionale, regionale, locale). Il contrasto all'AMR, tuttavia, necessita di una conoscenza accurata del problema, per cui sono necessari

strumenti atti a valutare l'andamento del fenomeno e di eventuali misure di controllo. Pertanto, la sorveglianza dell'AMR rappresenta un punto chiave di tutte le strategie raccomandate per combatterla (EU, WHO, FAO, OIE). Le attività di sorveglianza sono di particolare importanza affinché il problema sia riconosciuto e affrontato nei diversi ambiti, per la programmazione degli interventi e la loro valutazione; per il monitoraggio del fenomeno; per l'identificazione di eventi inattesi pericolosi per la salute pubblica, quali cambiamenti nei pattern di AMR (emergenza e diffusione di nuove resistenze) e focolai epidemici; per attuare misure di contenimento tempestive e per valutare l'efficacia degli interventi di controllo e *stewardship* messi in atto (PNCAR 2017-20).

Il programma di '*antimicrobial stewardship*' in Italia dovrebbe essere indirizzati verso molteplici azioni prioritarie (Menichetti F et al., 2018), quali:

- ottenere una copertura immunitaria, mediante strategie vaccinali, adeguata che avrebbe un impatto positivo sull'uso di antimicrobici e, di conseguenza, sulla resistenza antimicrobica;
- effettuare una profilassi antibiotica appropriata, che può ridurre il rischio di infezione in pazienti sottoposti a procedure chirurgiche, evitando un uso indiscriminato che aumenta la pressione selettiva e promuove la comparsa di ceppi di AMR (Sinha B et al., 2014);
- ridurre il rischio di infezioni correlate all'assistenza (ICA), attraverso strategie mirate al controllo delle infezioni soprattutto nelle popolazioni sensibili, sia negli ospedali per acuti, sia nelle strutture di lungodegenza;
- evitare l'uso non necessario di antibiotici negli animali e nell'agricoltura, che causerebbe lo sviluppo di batteri resistenti agli antibiotici e la selezione di geni di resistenza che possono essere trasferiti alle persone attraverso la contaminazione ambientale (Marshall BM, Levy SB, 2011);
- usare biomarcatori per monitorare il decorso clinico e la risposta agli antibiotici e guidare la terapia (David N et al., 2017);

- ottenere diagnosi microbiologiche precoci, affinché le ospedalizzazioni e il consumo di antibiotici siano minori, con risparmio economico e riduzione della pressione selettiva (Buehler SS et al., 2016);
- ridurre l'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro di azione, in favore di quelli a spettro ristretto, permettendo una riduzione della pressione selettiva e una riduzione dei costi;
- evitare dosaggi di trattamenti antibiotici errati oppure troppo lunghi;
- investire in supporto amministrativo e risorse umane.

Un esempio interessante di contenimento di un focolaio epidemico da *K. pneumoniae* produttore di carbapenemasi (KPC) si è verificato in Israele, grazie all'applicazione di misure di isolamento e posizionamento dei pazienti in unità autonome dotate di infermieri dedicati e isolamento obbligatorio dei portatori noti a livello ospedaliero (Schwaberet MJ al., 2011).

## 2.4. Le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)

La scoperta della penicillina da parte di Alexander Fleming, seguita dalla continua scoperta e dall'uso di nuovi antibiotici nei decenni successivi, ha aperto alla cosiddetta '*antibiotic era*', nella quale la gestione delle malattie associate a batteri patogeni era considerata un ovvio successo e le infezioni non rappresentavano una minaccia per l'uomo o gli animali (D'Accolti M et al., 2019). Da quel momento, l'improprio ed eccessivo uso degli antibiotici ha creato una pressione selettiva selezionando ceppi resistenti, in grado di sopravvivere ai trattamenti terapeutici. La resistenza agli antimicrobici è particolarmente pericolosa nei soggetti ospedalizzati, poiché durante il ricovero il 5-15% dei pazienti acquisisce le cosiddette ICA, che sono perlopiù sostenute da microrganismi multiresistenti (MDR) (Caini S et al., 2013; Cornejo-Juárez P et al., 2015), sensibili solo a una o due classi antimicrobiche (Extensively Drug Resistant - XDR) (Basak S et al., 2016) o sensibili solo a uno o due potenziali farmaci attivi o resistenti a tutti gli agenti antibatterici disponibili (Pan Drug Resistant - PDR) (Pontikis K et al., 2014), rendendo molto difficile o impossibile il successo terapeutico (Di Tella D et al., 2019). Secondo l'ECDC, in Europa, circa 3 milioni di pazienti contraggono almeno una ICA negli ospedali per acuti ogni anno e 37.000 pazienti muoiono come conseguenza diretta dell'infezione (European Centre for Disease Prevention and Control 2013; Brusaferrò S et al., 2015; Cassini A et al., 2016). Di recente, nell'UE, sono stati accertati 426.277 casi di ICA da microrganismi resistenti agli antimicrobici ogni anno (Cassini A et al., 2019). In Italia, l'incidenza dell'ICA è del 5-10%, con infezioni causate da microrganismi MDR sempre più comuni e con un tasso di mortalità del 20-30% (Messineo A, Marsella LT, 2015).

Esiste un'importante differenza nelle dinamiche di trasmissione tra microrganismi che causano malattie infettive classiche e microrganismi resistenti a più farmaci. Diversamente dalle malattie infettive classiche (morbillo, tubercolosi, malaria), le ICA causate da batteri resistenti agli antibiotici non presentano un periodo di incubazione definito, né prevedono vie di trasmissione naturali (*droplet*

aero-disperse, per contatto con goccioline, per via fecale-orale). Questo perché l'ospedale e le nuove procedure cliniche (ad esempio, uso di endoscopi, respiratori e cateteri) rappresentano fonti di infezione e modalità di trasmissione che non sono state ancora descritte. Per questo, impianti e dispositivi medici su cui si formano biofilm, interventi medici invasivi e un microambiente in evoluzione sono importanti fattori di rischio (Friedrich A, 2019). Sulla base di numerose osservazioni, l'ambiente ospedaliero svolge un ruolo importante nella trasmissione dell'ICA, in quanto rappresenta un serbatoio di agenti patogeni, che possono essere facilmente diffusi da pazienti, visitatori e personale ospedaliero (D'Accolti M et al., 2019). Infatti, i microrganismi hanno la capacità di sopravvivere per lunghi periodi di tempo sulle superfici (Kramer A et al., 2006), da dove possono essere facilmente trasmessi ai pazienti tramite contatto diretto o indiretto (Otter J et al., 2013). Appare evidente la correlazione diretta tra la contaminazione di superfici e l'insorgenza di ICA, poiché il rischio di acquisire un patogeno aumenta quando un paziente viene ricoverato in una stanza precedentemente occupata da pazienti colonizzati o infetti da quello specifico agente infettivo (D'Accolti M et al., 2019). *Staphylococcus aureus*, Enterobatteri tra cui *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* sono solo alcuni dei patogeni più comuni correlati all'insorgenza di ICA, anche associati all'AMR, che possono persistere a lungo nell'ambiente ospedaliero (Grundmann H et al., 2017; D'Accolti M et al., 2019). In particolare, gli Enterobatteri che producono beta-lattamasi a spettro esteso e carbapenemasi sono in costante aumento nel *setting* ospedaliero e le infezioni da essi causate sono spesso associate ad una elevata mortalità (Palacios-Baena ZR et al., 2017; Ripabelli G et al., 2018; Di Tella D et al., 2019). Infatti, gli Enterobatteri resistenti ai carbapenemi sono stati inclusi nella lista dei patogeni prioritari a livello globale e sono stati classificati come una priorità 'critica' (WHO, 2017).

## 2.5. I microrganismi 'ESKAPE'

Il termine 'ESKAPE' è un acronimo utilizzato per identificare sei batteri patogeni che presentano spiccata virulenza ed elevata resistenza agli antibiotici, includendo *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Rice LB, 2008). I patogeni ESKAPE sono responsabili della maggior parte delle infezioni nosocomiali, sono in grado di sfuggire (“*escape*”) all'azione biocida degli agenti antimicrobici (Rice LB, 2008; Navidin M, 2016) e sono associati ad un alto rischio di mortalità, con conseguente aumento dei costi sanitari (Founou RC et al., 2017). L'OMS ha recentemente inserito i patogeni ESKAPE nell'elenco dei 12 batteri contro i quali è necessario lo sviluppo di nuovi antibiotici (Tacconelli E et al., 2018) e di questi, in particolare *A. baumannii*, resistente ai carbapenemi, e *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi e ai beta-lattamici a spettro esteso, sono inseriti nell'elenco dei patogeni con priorità critica. I meccanismi di resistenza caratteristici dei microrganismi 'ESKAPE' sono raggruppati in tre categorie: *i*) inattivazione del farmaco comunemente catalizzata da un enzima; *ii*) modificazione del sito bersaglio a cui l'antibiotico può legarsi; *iii*) riduzione dell'accumulo di farmaco a causa della ridotta permeabilità o aumento dell'estrusione mediante pompe di efflusso (Santajit S, Indrawattana N, 2016). Tali patogeni sono anche in grado di formare biofilm che impediscono fisicamente alle cellule del sistema immunitario dell'ospite e agli antibiotici di esplicare la propria attività. I biofilm, inoltre, proteggono le cellule dormienti specializzate, chiamate cellule persistenti, che sono tolleranti agli antibiotici che causano infezioni recalcitranti e difficili da trattare (Mulani M et al., 2019).

### 2.5.1. *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* è la specie del genere *Klebsiella* spp. più rilevante dal punto di vista clinico (Pitout JDD et al., 2015). È un patogeno opportunisto che, in soggetti immunocompromessi, può causare una vasta gamma di infezioni, tra cui polmonite, infezione del tratto urinario, batteriemia e meningite, soprattutto in individui che soffrono di diabete o neoplasie (Paczosa MK, Mecsas J, 2016).

*K. pneumoniae* ha una capsula di polisaccaridi che è importante per la sua patogenesi e la capacità di evitare la fagocitosi (Cortés et al., 2002). Lo studio di prevalenza puntuale delle ICA e dell'uso di antimicrobici negli ospedali per acuti (Point Prevalence Survey), effettuato nel 2011-2012 dall'ECDC, ha identificato *K. pneumoniae* quale responsabile del 6,8% delle ICA, rappresentando la seconda specie nelle *Enterobacteriaceae* dopo *E. coli* maggiormente isolata nel *setting* ospedaliero (ECDC, 2013). Mentre nel 2005, in tutti i Paesi europei non è stato segnalato alcun isolamento di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi, durante un periodo di 10 anni (2005-2015), è emersa un'elevata prevalenza di ceppi resistenti, raggiungendo tassi del 40-60% (Navon-Venezia S et al., 2017). Nello studio Top TEn Microorganisms (TOTEM), *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi è stato classificato tra i più critici agenti patogeni resistente agli antibiotici che è causa di infezioni nosocomiali, soprattutto nei reparti di terapia intensiva (Rello J et al., 2019). Infatti, è stato riportato che su 5331 casi di batteriemia causati da *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi, il 96,8% è attribuibile a *K. pneumoniae* (Sabbatucci M et al., 2018). A livello EU/EEA, nel 2017, il 34% degli isolati di *K. pneumoniae* notificati all'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) mostrava resistenza almeno ad un gruppo di antibiotici sotto sorveglianza, inclusi i carbapenemi (ECDC, 2018). La produzione di carbapenemasi, in particolare di KPC, rappresenta il meccanismo prevalente di resistenza ai carbapenemi in *K. pneumoniae* (Girmentia C et al., 2016; Sabbatucci M et al., 2018), seguito dalla produzione delle carbapenemasi GES, NDM, IMP, VIM e OXA (Munoz-Price LS et al., 2013). L'isolamento di ceppi di *K. pneumoniae* positivi a *bla*<sub>KPC</sub> ha raggiunto dei livelli endemici in Italia; infatti, circa il 90% di ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai

carbapenemi sono produttori di KPC, seguiti da *bla*<sub>VIM</sub> (9,2%) e *bla*<sub>OXA-48</sub> (1,3%) (Giani T et al., 2015; Ripabelli G et al., 2018; Di Tella D et al., 2019).

In *K. pneumoniae*, sono spesso presenti anche i geni codificanti per le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), coinvolti nella resistenza alle oximino-cefalosporine e in grado di idrolizzare i beta-lattamici (Ghasemi Y et al., 2013). Durante il periodo 1990-2000, *K. pneumoniae* è diventato il microrganismo con produzione di ESBL maggiormente coinvolto negli eventi epidemici nel contesto ospedaliero, soprattutto per la produzione di *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> (Calbo E, Garau J, 2015). L'aumento della prevalenza dei batteri Gram-negativi multiresistenti (MDR) ha causato la riconsiderazione della colistina, soprattutto per il trattamento delle infezioni sostenute da *K. pneumoniae* (Rello J et al., 2019). Tuttavia, negli ultimi anni, anche la resistenza alla colistina è significativamente emersa in ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi e con livelli piuttosto alti, che si attestano intorno al 36% (Cannatelli A et al., 2014; Jafari Z et al., 2019). Questo tipo di resistenza è dovuta a modificazioni strutturali del lipopolisaccaride (LPS) batterico, che rappresenta il target della colistina. Uno dei meccanismi di resistenza più frequentemente riportati in *K. pneumoniae* è rappresentato dall'inattivazione del gene *mgrB*, coinvolto nella down-regolazione del sistema Pmr (Cannatelli A et al., 2013; Poirel L et al., 2015). Altri meccanismi di resistenza, che coinvolgono sempre l'LPS, sono codificati dai geni *mcr* che svolgono un ruolo cruciale nella resistenza alla colistina mediata da plasmidi (varianti *mcr*-1,2,3,4,5,6,7,8) (Carattoli A et al., 2016; Barbieri NL et al., 2017; Xavier B et al., 2016; Yin W et al., 2017; Borowiak M et al., 2017; Wang X et al., 2018; Yang YQ et al., 2018).



### 2.5.2. *Acinetobacter baumannii*

I batteri del genere *Acinetobacter* spp. appartengono alla famiglia delle Moraxellaceae. Essi comprendono coccobacilli Gram-negativi, catalasi positivi, ossidasi negativi e non fermentanti. Tali microrganismi sono immobili, ma alcuni ceppi mostrano una motilità associata alla presenza di fimbrie. Sono microrganismi aerobi stretti, che possono utilizzare una grande varietà di substrati come fonte di carbonio e crescono facilmente sui più comuni terreni di isolamento ad una temperatura di crescita ottimale di 33-37°C (Kuo S et al., 2006). Come tutti i batteri Gram-negativi, *Acinetobacter* spp. è caratterizzato dalla presenza di una tipica membrana esterna, costituita da un doppio strato fosfolipidico, alla quale si trovano ancorati i lipopolisaccaridi e diverse proteine di membrana, tra cui le porine che, formando canali idrofili, consentono il passaggio e l'assorbimento di piccole molecole, compresi gli antibiotici. I batteri del genere *Acinetobacter* spp. sono ubiquitari in natura e possono essere riscontrati nel suolo, nell'acqua ed in una ampia varietà di alimenti, soprattutto in ambiente sia umido. Questi ceppi di origine ambientale spesso presentano meccanismi di resistenza agli antibiotici, tra cui produzione di carbapenemasi e ESBL (Al Atrouni A et al., 2016). Sono, inoltre, parte della flora batterica umana, colonizzano la cute e le mucose del tratto respiratorio, intestinale e genitourinario e vengono comunemente isolati in ambiente ospedaliero (Aoife H et al., 2012). Molte specie del genere *Acinetobacter* spp. sono patogene opportuniste. Tra queste, *A. baumannii* è senza dubbio la specie più importante, che è passato dall'essere ritenuto un batterio con un basso livello di patogenicità a rappresentare uno dei patogeni nosocomiali più importanti associato a casi di ICA in tutto il mondo, soprattutto nei reparti di terapia intensiva (Lee C et al., 2017; Mohd Sazly LS et al., 2019). I primi casi di infezione sostenuti da *A. baumannii* sono emersi negli anni 60-70' in parallelo con l'utilizzo di cure più intensive (Wong D et al., 2016). Nei decenni successivi, tuttavia, il crescente utilizzo della ventilazione meccanica, del catetere venoso centrale e urinario e della terapia antibiotica ha causato un aumento della frequenza e della gravità delle infezioni da *Acinetobacter* (Spellberg B et al., 2014; Wong D et al., 2016). La prevalenza di ceppi MDR di *A. baumannii* in pazienti affetti da

polmonite ospedaliera si attesta tra il 40 e il 95% ed è associata a mortalità nel 45-85% dei casi (Almomani B et al., 2015; Nowak J et al., 2017; Ziółkowski G et al., 2018). *Acinetobacter* spp. può determinare l'insorgenza di infezioni attraverso il contatto con superfici ambientali e la colonizzazione transitoria delle mani degli operatori sanitari (Spellberg B, Bonomo RA, 2013).

Gli isolati di *A. baumannii* sono sempre più resistenti ai carbapenemi (Poirel L, Nordmann P, 2006; Perez F et al., 2007, Souli M et al., 2008; Zarrilli R et al., 2009). Tale resistenza spesso è mediata dalla produzione di oxacillinasi (OXA) e meno frequentemente dalle metallo- $\beta$ -Lattamasi (M $\beta$ L) (Zarrilli R et al., 2009; Azimi L et al., 2013).

### 2.5.3. Meccanismi di resistenza nei patogeni 'ESKAPE'

I geni implicati nella resistenza agli antimicrobici possono trovarsi sul cromosoma batterico, su plasmidi o essere mediati da trasposoni (Giedraitiene A et al., 2011). I meccanismi di resistenza ai farmaci rientrano in diverse grandi categorie, tra cui: *a*) inattivazione o alterazione del farmaco; *b*) modifica del sito target; *c*) cambiamenti nella permeabilità della membrana cellulare con conseguente riduzione dell'accumulo di farmaci a livello intracellulare; *d*) aumento dell'estrusione dei farmaci dall'ambiente intracellulare mediante pompe di efflusso e formazione di biofilm (Santajit S, Indrawattana N, 2016).

- Inattivazione o alterazione del farmaco

Molti batteri producono enzimi che modificano e inattivano irreversibilmente gli antibiotici, come le beta-lattamasi, enzimi modificanti gli aminoglicosidi o acetiltransferasi cloramfenicolici. Le beta-lattamasi agiscono idrolizzando l'anello  $\beta$ -lattamico indispensabile per l'attività di penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi (Jacoby G, 2009).

- Modifica del sito target dell'antibiotico

Alcuni batteri resistenti evitano il riconoscimento da parte degli agenti antimicrobici modificando i loro siti bersaglio come avviene nel caso della mutazione del gene che codifica per le proteine leganti la penicillina (Penicillin Binding Protein - PBP), enzimi tipicamente ancorati alla membrana citoplasmatica della parete cellulare batterica che rappresentano il sito target per il legame con la penicillina. In *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA), ad esempio, la variante PBP2a viene espressa maggiormente rispetto ai PBP nativi ed ha una bassa affinità per tutti gli antibiotici beta-lattamici, consentendo la sopravvivenza di *S. aureus* in presenza di alte concentrazioni di tali farmaci, inclusa la meticillina, che agisce sulla biosintesi della parete cellulare (Tang S et al., 2014).

- Ridotto accumulo di farmaco a livello intracellulare

L'equilibrio tra assorbimento ed eliminazione di antibiotici determina la suscettibilità dei batteri a un particolare farmaco. Pertanto, ridurre la quantità di antibiotico in grado di passare attraverso la membrana cellulare batterica è una strategia utilizzata dai batteri per sviluppare la resistenza agli antibiotici. I meccanismi attraverso i quali i batteri raggiungono questo obiettivo comprendono la perdita di canali proteici, come le porine sulla membrana esterna, che permettono l'ingresso nella cellula a sostanze idrofiliche, tra cui gli antibiotici, e/o la presenza di pompe di efflusso, che agiscono estrudendo l'antibiotico.

- Formazione di biofilm

I biofilm sono comunità microbiche complesse che si trovano su superfici biotiche o abiotiche, impiantate in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari. I microrganismi all'interno del biofilm possono interagire tra loro e con l'ambiente. I componenti principali della matrice sono le sostanze polimeriche extracellulari costituite principalmente da polisaccaridi, proteine, lipidi e DNA extracellulare e secrete dai microrganismi (Sharma G et al., 2014). Esistono tre passaggi chiave nella formazione del biofilm. Il primo consiste nell'adesione, che si verifica quando le cellule raggiungono una superficie e si ancorano al sito. Seguono le fasi di crescita e maturazione, che avvengono quando i microrganismi iniziano a generare l'eso-polisaccaride che stabilisce la

matrice e quindi maturano da microcolonie di cellule multistrato. Il passaggio finale è il distacco, che può essere attivo, se originato dal raggiungimento del numero massimo “consentito” di cellule (*quorum sensing*) o dalla degradazione enzimatica della matrice del biofilm, e passivo se causato da forze esterne. È probabile che la matrice dei biofilm fornisca uno scudo meccanico e biochimico che instaura le condizioni necessarie per attenuare l'attività dei farmaci. In queste condizioni, è difficile eliminare i batteri usando antibiotici convenzionali. Inoltre, quando i batteri avvertono una scarsità di nutrienti, potrebbero diventare tolleranti agli antibiotici. Questo può spiegare l'apparente maggiore resistenza agli antibiotici delle cellule negli strati profondi di un biofilm (i batteri estratti dai biofilm e coltivati successivamente recuperano la completa suscettibilità, indicando che la resistenza è fenotipica e non genotipica) (del Pozo JL, Patel R, 2010). I più comuni patogeni riscontrati nei biofilm in ambito sanitario sono *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (Høiby N et al., 2010).

### 2.5.3.1. I beta-lattamici

I  $\beta$ -lattamici sono una classe molto ampia di antibiotici che, sebbene presentino piccole variazioni nella struttura chimica, nello spettro d'azione, nella farmacocinetica e nell'efficienza contro ceppi resistenti, condividono il medesimo meccanismo di azione di inibizione della sintesi della parete cellulare batterica. Tutti gli antibiotici di questa classe presentano un nucleo funzionale principale, un'ammide ciclica nota come  $\beta$ -lattame e un anello a 4 atomi, che può trovarsi come unico costituente della molecola oppure associato ad altre strutture cicliche di cinque o sei atomi ed è costituito o meno da eteroatomi. In base alla natura del ciclo e alla presenza di eteroatomi, sono stati suddivisi in:

- penicilline, i primi antimicrobici ad essere stati scoperti (Bennett J, Chung K. 2001), costituiti da un anello a 5 atomi contenente un atomo di S;

- cefalosporine, costituiti da un anello insaturo a 6 atomi, con un atomo di S;
- carbapenemi, costituiti da un anello a 5 atomi, con un doppio legame;
- monobattami, costituiti da un'ammide ciclica di 4 atomi.

I  $\beta$ -lattamici bloccano l'attività della transpeptidasi, nota come PBP, enzima responsabile della formazione dei legami crociati, necessari per il rafforzamento della struttura del peptidoglicano, componente essenziale della parete cellulare che fornisce rigidità, stabilità meccanica e resistenza alla lisi osmotica (Cho H et al., 2014). Il blocco viene realizzato attraverso l'interazione irreversibile tra l'antibiotico e una serina presente nel sito attivo dell'enzima. Il  $\beta$ -lattamico va a mimare la sequenza amminoacidica D-Ala-D-Ala del pentapeptide della catena laterale del peptidoglicano, substrato della transpeptidasi, grazie all'omologia sterica presente tra la distanza tra il gruppo carbonile e l'ammide ciclica con le due alanine. L'acilazione irreversibile della serina transpeptidasi a livello del sito attivo rende inattivo il pentapeptide della catena laterale del peptidoglicano, ma contemporaneamente perde la propria struttura  $\beta$ -lattamica. La parete risulta indebolita e la cellula batterica diventa suscettibile alla lisi. Le perturbazioni indotte dai  $\beta$ -lattamici nella formazione della parete spiegano l'inibizione della crescita. Tali antibiotici, infatti, risultano attivi principalmente sui microrganismi in attiva divisione, mentre hanno pochi effetti su quelli in fase di latenza. Nei Gram-negativi, tra la membrana esterna e quella citoplasmatica, è presente lo spazio periplasmatico che, oltre ad essere sede della parete di peptidoglicano, è anche sede delle transpeptidasi e degli enzimi  $\beta$ -lattamasi, capaci di idrolizzare l'anello  $\beta$ -lattamico degli antibiotici. L'attacco di questi ultimi ai propri bersagli è reso difficile dall'organizzazione strutturale dei Gram-negativi, in quanto l'antibiotico deve attraversare la membrana esterna o per diffusione passiva o mediante le porine, mentre nei Gram-positivi sono immediatamente accessibili (Eckburg P et al., 2019).

### 2.5.3.2. I carbapenemi

Tra i diversi  $\beta$ -lattamici, i carbapenemi possiedono il più ampio spettro antibatterico *in vitro*, non solo tra i  $\beta$ -lattamici, ma anche tra le altre classi di antibiotici ed anche un'estesa attività contro i batteri sia Gram-positivi, sia Gram-negativi (Papp-Wallace KM et al., 2011). Di conseguenza, sono spesso utilizzati come antibiotici di ultima linea in pazienti che hanno contratto infezioni causate da batteri patogeni resistenti alla terapia antibiotica di scelta. Tuttavia, la recente comparsa di patogeni MDR rappresenta una seria minaccia per l'attività di questa classe di farmaci.

In seguito alla scoperta delle  $\beta$ -lattamasi, ha avuto inizio la ricerca di inibitori di tali enzimi. Nel 1976, sono stati scoperti i primi inibitori di  $\beta$ -lattamasi, gli acidi olivanici, prodotti naturali del batterio Gram-positivo *Streptomyces clavuligerus*. Nonostante l'ampio spettro d'azione, tali composti sono chimicamente instabili e per questo non sono stati ulteriormente studiati. Da allora, sono stati identificati altri due inibitori delle  $\beta$ -lattamasi: acido clavulanico da *Streptomyces clavuligerus* e tienamicina da *Streptomyces cattleya*.

Il termine carbapeneme indica un composto chimico con una struttura costituita dall'anello  $\beta$ -lattamico della penicillina fuso con un anello pentatomico che ha un atomo di C al posto dell'atomo di S in posizione 1, un doppio legame tra C-2 e C-3 e una catena laterale cisto-aminica in posizione C-2. La stereochimica di questa catena laterale è una caratteristica chiave dei carbapenemi ed è importante per la loro attività. Nonostante la tienamicina abbia dimostrato un ampio spettro d'azione e un'attività inibitoria contro le  $\beta$ -lattamasi e sia un prodotto naturale, del quale è stata determinata la via biosintetica, le rese del processo di purificazione sono state da sempre molto basse. Pertanto, con il tempo la preparazione sintetica di tienamicina ha assunto una maggiore importanza. L'instabilità chimica della tienamicina ha stimolato la ricerca di derivati omologhi con una stabilità maggiore e tra questi il primo sviluppato è stato l'N-formidoil-tienamicina, nota come imipenem. Quest'ultimo e altri carbapenemici strettamente correlati (panipenem) identificato successivamente, sono risultati derivati più stabili e meno sensibili all'idrolisi basica in soluzione.

Nel 1985, l'imipenem è divenuto il primo carbapeneme disponibile per il trattamento di infezioni microbiche complesse. Esso ha dimostrato, come il progenitore tienamicina, un'elevata affinità per le PBP e una buona stabilità contro le  $\beta$ -lattamasi. Tuttavia, sia imipenem, sia panipenem erano suscettibili alla disattivazione da parte di diidropeptidasi (DHP-I), localizzate a livello renale nell'uomo. Pertanto, si è resa necessaria la concomitante somministrazione di inibitori, come cilastatina e betamipron. Successivamente, sono stati sviluppati altri carbapenemi più stabili e con uno spettro d'azione più ampio, quali meropenem, biapenem, ertapenem e doripenem. Una delle principali innovazioni è stata l'aggiunta di un gruppo metilico in posizione 1- $\beta$  poiché risulta protettiva rispetto all'idrolisi operata dalla DHP-I (Papp-Wallace KM et al., 2011). Nei carbapenemi, l'atomo di C in posizione C-1 svolge un ruolo importante nella potenza dello spettro d'azione e nella stabilità contro le  $\beta$ -lattamasi. Inoltre, l'idrossi-etil nella catena laterale R2 aumenta la resistenza all'idrolisi da parte di  $\beta$ -lattamasi. La configurazione *trans* dell'anello  $\beta$ -lattamico al C-5 e C-6 stabilizza ulteriormente la molecola nei confronti dell'idrolisi da parte di  $\beta$ -lattamasi. I carbapenemi con un residuo di pirrolidina come catena laterale, ad esempio in panipenem, meropenem, ertapenem e doripenem, hanno lo spettro antimicrobico più ampio. Come altri  $\beta$ -lattamici, i carbapenemi non sono facilmente diffondibili attraverso la parete cellulare batterica. In generale, entrano nei Gram-negativi attraverso le proteine della membrana esterna (OMP), note anche come porine; dopo aver attraversato lo spazio periplasmatico, acilano in modo permanente le PBP, enzimi che catalizzano la formazione del peptidoglicano della parete cellulare, agendo da inibitori del dominio peptidasico delle PBP. La loro capacità di legarsi a diverse PBP rappresenta una caratteristica chiave dell'efficacia dei carbapenemi. Poiché la formazione della parete è un processo dinamico, l'autolisi continua portando all'indebolimento del peptidoglicano e alla rottura della cellula batterica a causa della pressione osmotica (Papp-Wallace KM et al., 2011).

### 2.5.3.3. Meccanismi di resistenza

Molti batteri Gram-negativi non-fermentanti (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), membri delle *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp.) e batteri Gram-positivi (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.) stanno acquisendo resistenza alla maggior parte dei carbapenemi clinicamente disponibili. I principali meccanismi alla base di tale resistenza comprendono la produzione di  $\beta$ -lattamasi, la sovra-espressione di pompe di efflusso, l'acquisizione di mutazioni che alterano l'espressione e/o la funzione delle porine e delle PBP. La combinazione di tali meccanismi può determinare elevati livelli di resistenza in alcune specie batteriche, come in *K. pneumoniae*.

Tra i meccanismi non associati alla produzione di carbapenemasi, un ruolo rilevante è svolto dalla ridotta produzione di porine. La membrana esterna dei batteri Gram-negativi forma una barriera idrofoba che protegge la cellula da agenti esterni, quali metalli pesanti e detergenti. Essa contiene proteine specifiche, chiamate porine, che formano canali idrofilici i quali consentono l'assorbimento selettivo di nutrienti essenziali e altri composti, compresi gli antibiotici. Nelle *Enterobacteriaceae*, le porine principalmente coinvolte nell'ingresso degli antibiotici appartengono alle famiglie OmpF o OmpC (Pagès J et al., 2008). Eventuali variazioni nel numero o nell'attività delle stesse potrebbero avere effetti a favore della resistenza agli antibiotici. La mutazione di un "gatekeeping loop" o canale centrale delle porine, una perdita di espressione o un cambiamento nel tipo di porine presenti nella membrana esterna, può diminuire la sensibilità agli antibiotici. Inoltre, la loro sintesi può essere regolata in risposta a composti antimicrobici o aromatici, attraverso varie reazioni a cascata, che coinvolgono gli operoni *mar* e *sox*, con una conseguente diminuzione del numero di porine nella membrana esterna (Nikaido H, 2003).

Negli Enterobatteri, la resistenza ai carbapenemi è stata osservata in seguito all'iper-espressione di un gene cromosomico *ampC* codificante per una cefalosporinasi intrinseca e all'esibizione di modifiche nelle porine OmpC o OmpF (Doumith M et al., 2009). Questo meccanismo di resistenza



ai carbapenemi è stato osservato anche in altri Enterobatteri che non esprimono tale cefalosporinasi, come in *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. In tal caso, la resistenza corrisponde alla combinazione dell'espressione di AmpC plasmidiche insieme ad una diminuita permeabilità della membrana cellulare (Shin S et al., 2012). I geni *ampC* portati da plasmidi sono spesso associati ad altri geni codificanti per la resistenza ad altri antibiotici (ad esempio, aminoglicosidi, tetracicline, sulfamidici) come conseguenza della co-localizzazione dei geni sugli stessi plasmidi (Martinez-Martinez L, 2008). Isolati che non producono carbapenemasi ma che mostrano resistenza ai carbapenemi sono generalmente meno resistenti agli antibiotici di altre famiglie. La resistenza mediata da AmpC non è trasferibile, a differenza dei geni codificanti per la maggior parte delle carbapenemasi. Per tale motivo, gli isolati carbapenemi-resistenti che non producono carbapenemasi destano minori preoccupazioni rispetto a quelli produttori di carbapenemasi in ambito clinico (Nordmann P et al., 2012).

La resistenza ai  $\beta$ -lattamici viene esplicita attraverso tre principali meccanismi. Il meccanismo più comune è la produzione di enzimi che degradano o modificano l'antibiotico prima che possa raggiungere il sito di destinazione. In questo caso, la famiglia di  $\beta$ -lattamasi degrada gli antibiotici aprendo l'anello  $\beta$ -lattamico e producendo un derivato inattivo. Questi enzimi sono ampiamente diffusi tra i batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Una volta prodotte, le  $\beta$ -lattamasi sono secrete nello spazio periplasmatico nei Gram-negativi, legate alla membrana citoplasmatica, o escrete nei Gram-positivi. Il secondo meccanismo è rappresentato dall'alterazione del sito bersaglio dell'antibiotico, ovvero delle transpeptidasi, che risultano avere una minore affinità per l'antibiotico. Il meccanismo finale è caratterizzato dalla riduzione o dal blocco dell'accesso dell'antibiotico al citoplasma mediante alterazione della permeabilità della membrana o dall'efflusso forzato (Wilke M et al., 2005).

### 2.5.3.3.1. $\beta$ -lattamasi

Le  $\beta$ -lattamasi rappresentano il principale meccanismo di difesa da parte dei batteri Gram-negativi contro diverse classi di agenti antimicrobici. Due sono gli schemi di classificazione delle  $\beta$ -lattamasi. La classificazione strutturale Ambler proposta nel 1980 (Ambler RP, 1980) si basa su analogie della sequenza amminoacidica, classificando le  $\beta$ -lattamasi in 4 gruppi, da A a D. Gli enzimi dei gruppi A, C e D sono serina-enzimi, mentre quelli del gruppo B sono metallo-enzimi. Anche se un approccio strutturale è il modo più semplice per classificare questo insieme eterogeneo di enzimi, la classificazione funzionale proposta da Bush nel 1989 (Bush K et al., 1995) e ampliata nel 1995, offre l'opportunità di mettere in relazione questi enzimi in base al loro ruolo clinico, ovvero fornendo informazioni sulla loro resistenza selettiva alle diverse classi di antibiotici  $\beta$ -lattamici. Lo schema aggiornato di Bush comprende:

- Gruppo 1 (classe C) - cefalosporinasi;
- Gruppo 2 (classi A e D) -  $\beta$ -lattamasi inibitori resistenti,  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e carbapenemasi a serina;
- Gruppo 3 (classe B): metallo- $\beta$ -lattamasi.

### 2.5.3.3.2. $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL)

Sebbene non vi sia una precisa ed univoca definizione, le ESBL vengono comunemente definite come enzimi portati da plasmidi che conferiscono resistenza a penicilline, cefalosporine di prima, seconda e terza generazione, monobattamici (ma non a carbapenemi e cefamicine) e che sono normalmente inibiti dagli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi, come l'acido clavulanico (Paterson DL et al., 2005). Tali enzimi derivano dal gruppo 2b (classificazione Bush) delle  $\beta$ -lattamasi (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) e appartengono al gruppo 2be dove la "e" sta ad indicare un esteso spettro d'azione. TEM-1 è la  $\beta$ -lattamasi mediata da plasmidi più comune nei bacilli enterici Gram-negativi (*E.*

*coli*), mentre SHV-1 è principalmente prodotto da ceppi di *K. pneumoniae*. TEM-2 è il membro meno comune del gruppo delle  $\beta$ -lattamasi e manifesta caratteristiche biochimiche identiche a TEM-1 (Paterson DL et al., 2005). Le ESBL che derivano da TEM-1, TEM-2 o SHV-1 differiscono dai loro progenitori per uno o pochi amminoacidi e ciò comporta un cambiamento nell'attività idrolitica dell'enzima, il cui spettro d'azione risulta essere ancor più esteso dell'enzima progenitore (Paterson DL et al., 2005).

La prima  $\beta$ -lattamasi mediata da plasmidi, TEM-1, fu descritta nel 1965 ed isolata dal paziente chiamato Temoneira (da cui il nome) ad Atene; da allora, si è diffusa in tutto il mondo ed è prodotta da numerose specie della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Nei primi anni 80', in risposta alla crescente prevalenza e diffusione delle  $\beta$ -lattamasi, furono introdotte le cefalosporine di terza generazione nella pratica clinica. Tuttavia, è emersa rapidamente anche la resistenza a queste molecole e la prima evidenza di un enzima SHV-2 in grado di idrolizzare questi antibiotici è stata pubblicata nel 1983 in Germania (Paterson DL et al., 2005).

Un altro grande gruppo di enzimi ESBL è rappresentato da CTX-M, che comprende più di 40 membri, ampiamente diffusi in tutto il mondo. Enterobatteri produttori di enzimi CTX-M sono stati isolati principalmente in ambito comunitario, come responsabili di infezioni del tratto urinario (Rawat D, Nair D, 2010).

#### **2.5.3.3.3. AmpC $\beta$ -lattamasi**

Nella classificazione strutturale Ambler delle  $\beta$ -lattamasi (Ambler RP, 1980), gli enzimi AmpC appartengono alla classe C, mentre nello schema di classificazione funzionale di Bush sono assegnati al gruppo 1 (Bush K et al., 1995). Questi enzimi possono essere cromosomici o codificati da plasmidi. Le  $\beta$ -lattamasi AmpC conferiscono resistenza alle oximino-cefalosporine (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone), alle cefalosporine del gruppo 7- $\alpha$  metossi (cefexitina o

cefotetan) e non sono influenzati dagli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam). Inoltre, ACT-1, DHA-1, CMY-2, CMY-10 esibiscono un'attività catalitica per imipenem (Jeon JH et al., 2015). Le AmpC  $\beta$ -lattamasi mediate da plasmidi, come quelle espresse in *K. pneumoniae* (CMY-1, CMY-2, CMY-8, CMY-12, MOX-1, MOX-2, FOX-1, FOX-5, LAT-1, LAT-2, LAT-2b, ACT-1, MIR-1, ACC-1, ACT-3, DHA-2 e DHA-3), differiscono da quelle cromosomiche in quanto non sono inducibili e sono tipicamente associate ad AMR. Le opzioni di trattamento per le infezioni causate da organismi che esprimono AmpC sono limitate (Gupta V et al., 2012). Tali  $\beta$ -lattamasi sono state osservate frequentemente in ceppi di *K. pneumoniae*, ma anche in altre specie, come *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis*. La distribuzione globale di tali enzimi è molto ampia: Africa (Algeria, Tunisia), Asia (India, Giappone, Pakistan, Corea del Sud), Europa (Francia, Germania, Grecia, Italia, Svezia, Regno Unito), Medio Oriente (Arabia Saudita) e America (Stati Uniti, Argentina, Guatemala)

I geni *bla* sono presenti su plasmidi differenti, ma spesso coesistono sullo stesso plasmide. Ad esempio, il gene codificante per la  $\beta$ -lattamasi ACT-1, ritrovato in isolati clinici, può essere correlato con TEM-10 o TEM-26 oppure con SHV-1 o TEM-1. Molti geni di resistenza, inclusi quelli appartenenti alle classi Ambler A, B e D sono collocati in cassette geniche con un elemento di 59 basi a valle che funge da sito di ricombinazione, diversamente dai geni AmpC, che sono parte di un integrone e non sono incorporati in una cassetta genica. Altri geni *bla*AmpC sono adiacenti ad una comune sequenza di inserzione (ISCR1) coinvolta nella mobilitazione genica, tipica degli integroni di classe 1 (Jacoby G, 2009). In molti Enterobatteri, la produzione di AmpC è inducibile tramite un sistema che coinvolge i geni *ampD*, *ampG* e *ampR* (Philippon A et al., 2002).

#### 2.5.3.3.4. Carbapenemasi

Le carbapenemasi rappresentano la famiglia di  $\beta$ -lattamasi più versatile, con uno spettro d'azione molto più ampio rispetto ad altri enzimi idrolitici lattamici. Alcuni ricercatori hanno preferito la nomenclatura “enzimi di idrolisi dei carbapenemi” invece che carbapenemasi, in quanto i carbapenemi sono solo una piccola parte del loro ampio spettro di substrati (Queenan AM, Bush K, 2007). Oltre a idrolizzare  $\beta$ -lattamici e cefalosporine di seconda e terza generazione, come le ESBL, riescono ad inattivare anche i carbapenemi. Le carbapenemasi di maggiore interesse epidemiologico e clinico per il loro profilo catalitico sono comprese nei gruppi A, B e D (Nordmann P, Poirel L 2014).

Le carbapenemasi possono essere codificate sia da geni (*bla*) a localizzazione cromosomiale, sia da geni trasferibili. Questi ultimi possono “muoversi” fra i microrganismi perlopiù attraverso plasmidi e meno frequentemente con il supporto di altri elementi detti trasposoni.

La resistenza dovuta alle carbapenemasi acquisite è stata evidenziata in ceppi patogeni Gram-negativi a partire dagli inizi degli anni '90. Gli isolamenti di bacilli MDR produttori di carbapenemasi e responsabili di *outbreak* in ambito nosocomiale sono rimasti limitati fino alla metà del 2000, allorché l'aumento della prevalenza, insieme alla comparsa di nuove varianti enzimatiche, ha raggiunto dimensioni epidemiologiche preoccupanti in tutto il mondo.

Le carbapenemasi, inoltre, presentano attività idrolitiche variabili; enzimi come le metallo- $\beta$ -Lattamasi (M $\beta$ L) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi (KPC) idrolizzano più efficientemente i carbapenemi rispetto a Oxacillin-hydrolysing carbapenemases (OXA). Tuttavia, di solito l'elevata resistenza ai carbapenemi di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi è associata ad alterazioni della permeabilità della membrana cellulare, indipendentemente dal tipo di carbapenemasi. Al contrario, ceppi di *K. pneumoniae* produttori di tutti i tipi di carbapenemasi presentano bassi valori di concentrazione minima inibente (Minimal Inhibitory Concentration - MIC) per i carbapenemi (Nordmann P, Poirel L, 2014). Le carbapenemasi sono classificate in

diverse classi:

- Classe A: carbapenemasi a serina

Tra i principali tipi di carbapenemasi di classe A ed importanti da un punto di vista clinico, KPC idrolizza una vasta gamma di  $\beta$ -lattamici, tra cui penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattamici (aztreonam), attraverso un meccanismo idrolitico che coinvolge un sito attivo contenente una serina in posizione 70. L'attività idrolitica è inibita *in vitro* da acido clavulanico e tazobactam. (Nordmann P et al., 2012).

Il primo produttore di KPC (KPC-2 in *K. pneumoniae*) fu identificato nel 1996 in Nord Carolina (Yigit H et al., 2001). Nel 1997, è stato isolato in alcuni ospedali di New York City (Bradford PA et al., 2004) e da allora ha continuato a diffondersi. Microrganismi produttori di enzimi KPC sono stati segnalati negli Stati Uniti (Kitchel B et al., 2009), ma con maggiore prevalenza nella parte orientale rispetto a quella occidentale e meridionale. La presenza di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC è considerata endemica nelle regioni del Medio Oriente, in Florida e Porto Rico e sono diffusi in tutto il mondo. Il primo Paese oltre gli Stati Uniti, che ha registrato un focolaio a livello locale è stato Israele (Samra Z et al., 2007). Un forte aumento del numero di isolati produttori di KPC in *K. pneumoniae* è stato registrato negli ospedali di Tel Aviv tra il 2005 e il 2006, risultati anche geneticamente correlati ai ceppi circolanti negli ospedali statunitensi (Navon-Venezia S et al., 2009). Altri Paesi che hanno registrato infezioni sostenute da tale microrganismo sono state la Grecia e l'Italia. Nei rapporti ISTISAN 17/18 è stato riportato che il 95,1% e il 77,5% rispettivamente di 1681 isolati di *K.pneumoniae* e di 17 isolati di *E. coli* è produttore di KPC, classificando l'Italia come un Paese iper-endemico per questa carbapenemasi.

Le carbapenemasi KPC e GES sono codificate da plasmidi e per tale motivo hanno il maggiore potenziale di diffusione e trasmissione. Inoltre, sebbene gli enzimi KPC siano prevalentemente prodotti da ceppi di *K. pneumoniae*, sono stati segnalati anche in altre specie, come *Enterobacter* e *Salmonella* spp. ed *E. coli*. (Ripabelli G et al., 2019). Le carbapenemasi di tipo KPC idrolizzano  $\beta$ -lattamici di tutte le classi, con l'idrolisi più efficiente osservata per nitrocefina, cefalotina,

cefaloridina, benzilpenicillina, ampicillina e piperacillina. Imipenem, meropenem, cefotaxime e aztreonam sono idrolizzati 10 volte meno efficientemente rispetto alle penicilline e cefalosporine. Inoltre, l'idrolisi osservata per cefoxitina e ceftazidime risulta debole, ma in ogni caso presente, confermando che KPC ha un ampio spettro di azione nei confronti di diversi antibiotici  $\beta$ -lattamici. Il trattamento delle infezioni causate da questi organismi è estremamente difficile a causa della loro multiresistenza, determinando alti tassi di mortalità (Ripabelli G et al., 2019).

I geni *blaKPC* sono portati da plasmidi e le sequenze adiacenti ad essi mostrano una limitata diversità, suggerendo la derivazione da una singola fonte. Tali geni sono contenuti nel trasposone Tn4401 (Trasposone Tn3), collocati tra sequenze ripetute ed invertite di circa 39 bp e delimitati da siti di duplicazione di circa 5 bp. Tale struttura indica che è avvenuto un processo di trasposizione replicativa (tipico dei trasposoni del tipo Tn3), che permette la diffusione di sequenze KPC tra diverse unità genetiche, portando a distinti plasmidi codificanti per KPC (Tzouvelekis LS et al., 2012). Ad oggi, sono state descritte più di 20 differenti varianti KPC, ma KPC-2 e KPC-3 rimangono le varianti più comunemente identificate (Walther-Rasmussen J, Hoiby N, 2007; Pitout JDD et al., 2015).

Un altro tipo di  $\beta$ -lattamasi è rappresentato dalla carbapenemasi Guiana Extended Spectrum (GES), inizialmente considerato un enzima della famiglia ESBL, perché GES-1 non possedeva attività carbapenemasi, ma successivamente furono identificate alcune varianti che la possedevano sebbene debole. Questi enzimi differiscono per la sostituzione di due amminoacidi e possiedono i motivi caratteristici del sito attivo degli enzimi di classe A, con residui di Cisteina nelle posizioni 69 e 238, riscontrati nella famiglia KPC. I geni codificanti per enzimi GES sono situati in integroni su plasmidi. Sono state descritte almeno 9 varianti di GES e GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6 hanno sostituzioni di Asparagina o Serina in posizione 170, associate all'idrolisi dell'imipenem (Lee SH, Jeong SH, 2005; Vourli S et al., 2004).

- Classe B: Metallo- $\beta$ -lattamasi

Le Metallo- $\beta$ -lattamasi (M $\beta$ L) costituiscono una classe di enzimi (classe B) che, nonostante la loro

diversità nella sequenza amminoacidica, condividono tre proprietà funzionali, ovvero la capacità di idrolizzare i carbapenemi, la resistenza agli inibitori e la sensibilità ad agenti chelanti, come EDTA. Quest'ultima proprietà è dovuta al meccanismo di idrolisi, in cui cationi bivalenti, generalmente ioni zinco ( $Zn^{2+}$ ), sono essenziali per l'attacco nucleofilo all'anello lattamico. Lo spettro di substrati di tali enzimi è abbastanza ampio: oltre ai carbapenemi, idrolizzano cefalosporine e penicilline, ma non sono in grado di idrolizzare aztreonam, per la bassa affinità con cui le M $\beta$ L legano i monobattamici. Ciononostante, vi sono variazioni significative in termini di efficienza idrolitica, anche tra enzimi dello stesso tipo. Le prime M $\beta$ L identificate e analizzate erano cromosomali presenti in batteri opportunisti di origine ambientale. I geni codificanti per M $\beta$ L non sono facilmente trasferibili. Le principali proprietà distintive includono la presenza dello ione zinco per una efficiente idrolisi del  $\beta$ -lattame e l'assente suscettibilità all'inibizione da parte di acido clavulanico e tazobactam. L'analisi filogenetica ha suggerito l'esistenza di tre discendenti M $\beta$ Ls:  $\beta$ 1 e  $\beta$ 3. Il sottogruppo  $\beta$ 1 comprende gli enzimi del tipo Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase (VIM), Imipenem-resistant Pseudomonas (IMP), German Imipenemase (GIM) e New Delhi Metallo  $\beta$ -lattamasi (NDM). Di questi, VIM, IMP e NDM sono stati riscontrati in *K. pneumoniae*. Le varianti  $bla_{VIM}$  e  $bla_{IMP}$  identificate in *K. pneumoniae* sono presenti come "cassette geniche" incorporate in regioni variabili degli Integroni di classe 1, i quali se associati con plasmidi o trasposoni facilitano il trasferimento tra batteri. Al contrario, i geni  $bla_{NDM}$  non sono associati a integroni. Ceppi di *K. pneumoniae* produttori di VIM sono stati identificati per la prima volta tra il 2001 e il 2003 nel Sud Europa, in seguito anche in Nord Europa (Germania, Francia, Scandinavia) e negli Stati Uniti, soprattutto da pazienti colonizzati e trasferiti da aree ad alta prevalenza. Inoltre, casi sporadici sono stati registrati in Tunisia, Corea del Sud, Venezuela, mentre solo in Grecia sono stati registrati eventi epidemici (Queenan AM, Bush K, 2007).

Il primo ceppo produttore di IMP è stato descritto nel 1990, principalmente in Giappone, ma anche in Taiwan e Singapore. Ceppi di *K. pneumoniae* produttori di IMP-4 hanno anche causato epidemie



in *setting* ospedalieri in Cina e Australia (Queenan AM, Bush K, 2007).

Per quanto riguarda gli enzimi della famiglia NDM, M $\beta$ L di più recente scoperta, il principale serbatoio di eventi epidemici è stato il subcontinente indiano, dove è stata documentata ripetutamente un'elevata frequenza di isolamento in strutture di assistenza ed anche una vasta diffusione in differenti nicchie ambientali. Il primo ceppo di *K. pneumoniae* produttore di NDM fu identificato in un paziente indiano e residente in Svezia nel 2008, ricoverato per una infezione a New Delhi prima di far ritorno in Svezia (Yong D et al., 2009). La recente diffusione di ceppi produttori di NDM in Europa Occidentale, America del Nord, Australia e in Estremo Oriente è stata attribuita a pazienti provenienti soprattutto da India, Pakistan e Bangladesh (Nordmann P et al., 2011). Recentemente, in Italia sono stati isolati ceppi di *K. pneumoniae* produttori di NDM, a Catania (Gona F et al 2019) e in Toscana ed hanno causato un evento epidemico (ECDC, Rapid Risk Assessment 2019).

Dalla prima descrizione di NDM-1 sono state individuate più di 10 varianti di questo enzima, di cui la maggior parte ha avuto origine in Asia (Nordmann P, Poirel L, 2014; Pitout JDD et al., 2015). La maggior parte dei microrganismi produttori di NDM-1 codifica anche per altri meccanismi di resistenza, tra i quali:  $\beta$ -lattamasi AmpC mediate da plasmidi (soprattutto CMY), ESBL (soprattutto CTX-M-15), carbapenemasi (VIM e KPC), 16S rRNA metiltrasferasi, determinanti di resistenza ai chinoloni mediati da plasmidi, esterasi modificanti i macrolidi e enzimi modificanti rifampicina. Di conseguenza, Enterobatteri che producono enzimi di tipo NDM restano più suscettibili ad agenti come colistina, fosfomicina e tigeiclina (Nordmann P, Poirel L, 2014; Pitout JDD et al., 2015).

- Classe D: Oxa- $\beta$ -lattamasi

Le  $\beta$ -lattamasi di classe D, anche dette OXA (“Oxacillinasi, ovvero idrolizzanti Oxacillina”) hanno, nel complesso, un'attività carbapenemasi debole e non sono inibiti da acido clavulanico ed EDTA, ma da NaCl. Sebbene la maggior parte delle varianti di  $\beta$ -lattamasi di classe D idrolizzanti i carbapenemi siano stati individuati in *Acinetobacter* spp., OXA-48 è stato trovato solo nelle *Enterobacteriaceae*, soprattutto in ceppi di *K. pneumoniae* di origine nosocomiale e in

*E. coli* a livello extra-ospedaliero. Il primo produttore OXA-48 è stato identificato in un isolato di *K. pneumoniae* isolato in Turchia nel 2003 (Poirel L et al., 2004). Da allora, ceppi produttori di OXA-48 sono stati segnalati come responsabili di epidemie nel contesto nosocomiale in Turchia, Sud Europa e Africa (Nordmann P et al., 2011). Eventi sporadici ed epidemie ospedaliere sono state segnalate anche in Francia, Germania, Spagna, Paesi Bassi e Regno Unito (Nordmann P et al., 2011) in seguito al trasferimento di pazienti ospedalizzati da aree endemiche. In Italia, sono stati riportati diversi casi di *K. pneumoniae* ma anche di *E. coli* produttori di OXA-48 (Giani T et al. 2012; Gaibani P et al., 2017). Recentemente, è stata segnalata anche la presenza di 2 nuovi sequence type (ST) di *K. pneumoniae* coproduttori di NDM-1 e OXA-48 (Gona F et al., 2019).

Il gene *bla*OXA-48 origina da un singolo plasmide di circa 62 kb, presente in diverse specie di Enterobatteri. Tale gene è collocato tra due elementi IS1999, coinvolti nella mobilitazione e nell'espressione dei geni di resistenza, formando un trasposone funzionale. L'attività idrolitica di OXA-48 si basa sulla rotazione nel sito attivo del gruppo  $\alpha$ -idrossietil del carbapeneme, in modo da consentire il movimento dell'acqua deacilante verso il residuo di serina acilata, che rilascia l'antibiotico inattivato dopo la rottura del legame C-N dell'anello lattamico. OXA-48 è in grado di idrolizzare anche penicilline e cefalosporine di prima generazione. Altre varianti di OXA-48 sono emerse in *K. pneumoniae*: OXA-181 e OXA-163 caratterizzate dalle stesse capacità idrolitiche di OXA-48, ma con localizzazione diversa (Tzouveleki LS et al., 2012; Saoussen O et al., 2015). Le OXA-lattamasi sono caratterizzate da un'ampia varietà di sequenze amminoacidiche. Tra i gruppi con attività carbapenemasi, è stata osservata una identità amminoacidica tra il 40% ed il 70% e all'interno di ogni gruppo l'identità è maggiore o uguale al 92,5%. Come gli enzimi di classe A, le carbapenemasi di classe D conservano diversi residui di serina e diversi motivi amminoacidici nel dominio catalitico, tipici delle carbapenemasi a serina. In Italia, è stato isolato *K. pneumoniae* produttore di OXA-48 a Catania (Gona F et al., 2019), ma la carbapenemasi OXA-23 in *A. baumannii* è diventata la oxacinillasi prevalente che ha raggiunto valori endemici (Principe, L et al., 2014).

### 2.5.3.3.5. Pompe di efflusso

Le pompe di efflusso sono componenti della membrana batterica che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi della cellula e nell'espulsione di composti tossici, compresi gli antibiotici (Coyne S et al., 2010). In particolare, esse contribuiscono alla resistenza agli antibiotici modulando la loro concentrazione cellulare all'interno delle cellule batteriche. In generale, esistono diverse famiglie di pompe di efflusso:

- RND (Resistance Nodulation Division);
- SMR (Small Multidrug Resistance);
- MFS (Major Facilities Superfamily);
- MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) (Blanchard C et al., 2014).

Dal punto di vista clinico, la principale famiglia in *A. baumannii* associata alla resistenza agli antibiotici, in particolar modo ai carbapenemi, è la famiglia RND. In questo batterio sono state caratterizzate tre pompe di efflusso di questa famiglia:

- AdeABC: implicata in meccanismi di resistenza multipla ed associata alla resistenza verso amminoglicosidi, cefepime, carbapenemi, cloramfenicolo e ad una diminuzione della suscettibilità ad altri antibiotici in generale;
- AdeFGH e AdeIJK associate alla resistenza a tigeciclina (Coyne S et al., 2010).

L'espressione di queste tre pompe è regolata da meccanismi diversi: il regolatore trascrizionale di tipo LysR (AdeL) è responsabile della trascrizione di *adeFGH*; l'espressione di *adeIJK* è regolata dal regolatore trascrizionale AdeN appartenente alla famiglia TetR; l'espressione di AdeABC è controllata da un sistema di regolazione a due componenti, AdeRS (Nowak J et al., 2016). La presenza di mutazioni, spesso dovute ad una sovraespressione di *adeB* e/o di una sequenza di inserzione ISAb1 in tale gene, può portare ad una sovraespressione dell'operone AdeABC, contribuendo alla resistenza antibiotica (Nowak J et al., 2016). Un regolatore negativo dell'espressione genica delle pompe di efflusso è rappresentato da *soxR*. SoxR è una proteina repressiva coinvolta nel fenomeno di multiresistenza nelle *Enterobacteriaceae* (Li H et al., 2017). Tale proteina, prodotta costitutivamente ad un basso livello, attiva l'espressione del gene *soxS* in risposta ad agenti generatori di superossido. L'attività di SoxS è regolata solo dalla sua

concentrazione intracellulare ed è attribuibile ad una mutazione *frameshift* (dovuta a un'inserzione o delezione di una coppia di basi) che tronca *soxR* ed è responsabile della resistenza ai fluorochinoloni in *E. coli* (Fàbrega A et al., 2010). In *K. pneumoniae*, una mutazione in *soxR* (C375G) provoca una sostituzione amminoacidica (N125K) nella proteina SoxR, inducendo la sovraespressione dei sistemi di efflusso, caratterizzati fenotipicamente da una multiresistenza (Bialek-Davenet S et al., 2011). Tuttavia, il contributo di SoxR alla resistenza agli antibiotici in *A. baumannii* non è stato ancora studiato in quanto in nessun ceppo esaminato è stato trovato il gene *soxS*. Pertanto, si ritiene che *soxR* possa regolare direttamente i geni bersaglio delle pompe di efflusso. La sovraespressione di questo regolatore in *A. baumannii*, oltre ad indurre una riduzione dell'espressione delle pompe di efflusso *abeS*, *abeM*, *adeJ* e *adeG* induce una maggiore suscettibilità a cloramfenicolo, tetraciclina, ciprofloxacina, amikacina e trimetoprim, ma non influenza la suscettibilità all'imipenem (Li H et al., 2017).

Le pompe di efflusso del tipo RND sono complessi tripartiti, composti da un trasportatore di efflusso (RND) localizzato nella membrana interna che interagisce con una proteina di membrana di fusione (MFP) ed un fattore di membrana esterno per l'esportazione degli antibiotici attraverso le membrane, guidati dalla forza motrice protonica (Coyne S et al., 2010; Nowak J et al., 2015). Tali pompe sono particolarmente preoccupanti per la loro capacità di essere attivate anche dopo l'esposizione ad un singolo agente antimicrobico (Peleg A et al., 2008). I principali geni della famiglia RND associati a meccanismi di resistenza agli antibiotici in *A. baumannii* sono *adeB*, *adeJ* e *adeG* (Nowak J et al., 2016).

Le pompe di efflusso di tipo SMR sono costituite da una proteina di trasporto situata nella membrana interna che si occupa dell'estrusione delle sostanze tossiche dalla cellula.

La principale pompa di efflusso della famiglia SMR è AbeS, associata alla resistenza a numerosi composti, tra cui cloramfenicolo, amikacina e ciprofloxacina (Srinivasan VB et al., 2009). La principale pompa di efflusso appartenenti alla famiglia MFS è CraA, associata alla resistenza al cloramfenicolo. Oltre a questa, ve ne sono altre (CMAA, TetA, AmvA ed AbaF) associate alla resistenza a diversi antibiotici. Nello specifico, la pompa di efflusso CMAA è associata alla resistenza a cloramfenicolo (Lee CR et al., 2017); TetA è associata alla resistenza alle tetracicline (Ribera A et al., 2003); AmvA è associata alla resistenza a differenti classi di antibiotici, disinfettanti, detergenti

e coloranti (Govindan R et al., 2010); AbaF è associata alla resistenza alla fosfomicina (Sharma A et al., 2016). La principale pompa di efflusso appartenente alla famiglia MATE è AbeM (Coyne S et al., 2010), che conferisce resistenza all'imipenem e a fluorochinoloni, amminoglicosidi, cloramfenicolo ed eritromicina (Su XZ et al., 2005; Blanchard C et al., 2014).

#### 2.5.3.4. La colistina

La colistina, nota anche come polimixina E, è un lipopeptide cationico multicomponente costituito da un eptapeptide ciclico con una catena laterale tripeptidica acilata all'N-terminale da un acido grasso (Karaïskos I et al., 2017). Questo antibiotico ha una storia unica rispetto agli altri. È stato introdotto per la prima volta negli anni 50' per il trattamento di infezioni sostenute da batteri Gram-negativi, ma negli anni 70' non è stato più utilizzato a causa della sua nefrotossicità (tasso del 50%) e neurotossicità, in favore di nuove molecole meno tossiche. Negli anni 90', la colistina è stata reintrodotta nella pratica clinica per fronteggiare l'emergenza di batteri Gram-negativi XDR resistenti a tutte le opzioni di trattamento. Le polimixine ora svolgono un ruolo critico, rappresentando una delle poche, talvolta le uniche, molecole a mantenere l'attività contro *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi e che spesso causano gravi infezioni, talvolta letali nei pazienti più vulnerabili (Ortwine JK et al., 2015).

La molecola è stata isolata da *Bacillus polymyxa* ed è costituita da due componenti principali: colistina A (polimixine E1) e colistina B (polimixine E2) (Orwa J et al., 2001)

La colistina agisce principalmente sulla superficie della membrana cellulare batterica sebbene siano state riportate alternative modalità di azione. L'esatto meccanismo dell'attività antibatterica delle polimixine non è completamente noto; tuttavia, la teoria più accreditata è che le polimixine abbiano azione battericida distruggendo le membrane esterne ed interne attraverso il percorso di 'auto-promozione dell'assorbimento'. Nei batteri Gram-negativi, la membrana esterna comprende un foglio interno di fosfolipidi e un foglio esterno di lipopolisaccaride (LPS), composto da lipidi A, core

oligosaccaridico e antigene O (Karaïskos I et al., 2016). L'effetto della colistina sulla membrana batterica può essere antagonizzato con alti livelli di cationi bivalenti (Karaïskos I et al., 2016). L'attività della colistina può essere sinergica a quella di altri antibiotici idrofili come rifampicina, carbapenemi, glicopeptidi o tetracicline che agiscono meglio a causa dell'interruzione dell'integrità della membrana (Biswas S et al., 2012).

Alcune segnalazioni hanno dimostrato che le polimixine agiscono attraverso un modo d'azione alternativo, che prevede l'inibizione dell'attività di tipo II della nicotinamide adenina dinucleotide (NADH)-chinone ossidoreduttasi (NDH-2) nella membrana interna dei batteri Gram-negativi (Deris ZZ et al., 2014).

#### 2.5.3.4.1. Resistenza alla colistina

I batteri Gram-negativi adottano diverse strategie per proteggersi dalla colistina, tra cui una varietà di modifiche ad LPS, l'uso di pompe di efflusso, la formazione di capsule e la sovra-espressione della proteina di membrana esterna OprH, che sono tutte efficacemente regolate a livello molecolare (Olaitan AO et al., 2014).

Alcuni batteri, come *Proteus* spp., *Serratia* spp. e *Burkholderia* spp. sono naturalmente resistenti alla colistina (agenti patogeni intrinsecamente resistenti), mentre altri batteri come *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* possono acquisire resistenza.

Negli isolati di *A. baumannii*, l'inattivazione (mediante mutazioni puntuali, delezioni o inserimento di sequenze) dei primi tre geni nella via della biosintesi lipidica A, *lpxA*, *lpxC* o *lpxD*, può comportare la perdita della produzione di LPS e un elevato livello resistenza alla colistina (Olaitan AO et al., 2014). Questo tipo di resistenza è dovuta a modificazioni strutturali di LPS, che rappresenta il target della colistina e può essere attribuita a diversi meccanismi. Tra i più riportati, vi è l'inattivazione del gene *mgrB* in *K. pneumoniae*, che codifica per una piccola proteina regolatoria transmembrana di 47

amminoacidi (Poirel L et al., 2015), coinvolta nella *down*-regolazione del sistema Pmr, composto a sua volta dai sistemi bicomponenti PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB (Velkov T et al., 2013; Cannatelli A et al., 2013; Poirel L et al., 2015). L'inattivazione del gene causa la neutralizzazione delle cariche negative mediante l'iper-modificazione dei fosfati lipidici A con aggiunta di gruppi caricati positivamente (4-ammino-4-desossi-L-arabinosio (L-Ara4N) e/o fosfoetanolamina (PEtN). La proteina MgrB viene prodotta all'attivazione del sistema di segnalazione di PhoPQ e ne inibisce il *pathway* di azione, che causerebbe la riduzione dell'affinità di legame tra la colistina e il suo target (Wright MS et al., 2015). Una mancata funzionalità della proteina MgrB è causa di resistenza alla colistina. Le alterazioni genetiche, che porterebbero all'acquisizione di resistenza nei confronti della colistina, maggiormente conosciute sono: Leu26Pro in PhoQ (Cheng YH et al., 2015), Leu82Arg (Cannatelli A et al., 2014) e Thr157Pro (Jayol A et al., 2014) in PmrB; l'inattivazione inserzionale da parte di un elemento (Sequenza di Inserzione, *IS*) in MgrB (Poirel L et al., 2015) come *IS5like* o altre; mutazioni non senso (Q30stop, C28stop); mutazioni missenso che portano alla terminazione prematura della proteina MgrB e mutazioni che causano sostituzioni di aminoacidi e conseguente perdita di funzionalità della proteina (Olaitan AO et al 2014; Jayol A et al., 2014; Zowawi H et al., 2015; Esposito EP et al., 2018).

L'aggiunta di fosfoetanolamina-PEtN può anche essere mediata dal plasmide attraverso il gene *mcr-1* (resistenza alla colistina mediata da plasmide), che conferisce la prima resistenza nota mediata dal plasmide alla colistina in batteri isolati sia in esseri umani, sia in animali (Liu Y et al., 2016). Il gene *mcr-1* era localizzato su un plasmide trasferibile (pHNSHP45) di *E. coli*, che poteva essere facilmente mobilizzato e, quindi, conferire resistenza a bassi livelli di colistina. Il plasmide è stato anche in grado di conferire resistenza a *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* mediante trasformazione, indicando la capacità del plasmide di essere coinvolto nella resistenza, oltre che nelle *Enterobacteriaceae*, anche nei bacilli non fermentanti (Liu Y et al., 2016). Da allora, numerosi studi hanno confermato la sua diffusione in tutto il mondo negli animali, negli isolati umani, negli alimenti e nei campioni ambientali, principalmente in *E. coli* (Elnahriry S et al., 2016; Cannatelli A et al., 2016), mentre

l'identificazione di ceppi *mcr-1* positivi negli alimenti importati, nei fiumi urbani e in viaggiatori evidenziano il potenziale di *mcr-1* di continuare a diffondersi (Nordmann P et al., 2016). In modo allarmante, *mcr-1* è stato identificato in diversi batteri MDR, tra cui *Enterobacteriaceae* produttori di ESBL e carbapenemasi (Nordman P et al 2016). Dopo *mcr-1*, sono state identificate numerose altre varianti del gene (*mcr-2,3,4,5,6,7,8*) (Carattoli A et al 2016; Xavier Bet al 2016; Barbieri NL et al 2017; Yin Wet al 2017; Borowiak M et al 2017; Wang X et al 2018; Yang et al 2018).



## 2.6. Alimenti e antibiotico-resistenza

Le malattie di origine alimentare sono un'importante causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo, ma è difficile definire il carico sanitario ed economico dovuto ad alimenti microbiologicamente non sicuri (WHO, 2015). Gli agenti patogeni possono contaminare il cibo in qualsiasi punto lungo la catena alimentare: presso l'azienda agricola, l'impianto di trasformazione, durante il trasporto, nei punti di vendita, nel servizio di ristorazione o in ambito domestico (Chapman B, Gunter C, 2018).

Quasi una persona su 10 nel mondo si ammala ogni anno a causa del consumo di alimenti contaminati; la gastroenterite è il sintomo più comune di malattia, con 550 milioni di casi e 230.000 morti ogni anno nel mondo (World Health Organization 2019). Nei bambini di età inferiore ai cinque anni, è stato associato il 40% del *burden* totale da malattie a trasmissione alimentare e talvolta presentano sequele potenzialmente permanenti. *Campylobacter jejuni* e *C. coli* e *Salmonella enterica* sono le cause più comuni di diarrea batterica a livello globale e sono responsabili rispettivamente di circa 96 e 80 milioni di infezioni ogni anno (WHO, 2015).

La presenza di agenti patogeni MDR negli alimenti di origine animale come latte, carne e pollame è notevolmente aumentata negli ultimi anni (Muloi D et al., 2018). La loro capacità di evolversi per acquisire nuove caratteristiche, in particolare, la resistenza a più farmaci, è divenuto un problema mondiale. Con la diffusione negli alimenti di origine animale a causa dell'abuso di farmaci antimicrobici negli allevamenti, alcuni batteri MDR responsabili di zoonosi sono in grado, oggi, di raggiungere il tratto intestinale umano veicolando tutti i geni di AMR (Muloi D et al., 2018; Pérez-Rodríguez F, Mercanoglu Taban B, 2019).

Le infezioni sostenute da batteri altamente resistenti non si limitano più alle sole ICA acquisite nel *setting* ospedaliero, dove la trasmissione di agenti patogeni avviene principalmente da persona infetta/colonizzata ad altre persone. Oggi, attraverso gli alimenti di origine animale contaminati, i patogeni MDR si diffondono, non solo ai gruppi ad alto rischio, come pazienti immunodepressi o vulnerabili, ma a tutta la popolazione (Pérez-Rodríguez F, Mercanoglu Taban B, 2019).

### 2.6.1. *Salmonella enterica non tifoidea*

*Salmonella* proviene dalla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è un patogeno clinicamente importante sia per gli animali sia per l'uomo poiché la sua nicchia ecologica principale è il tratto intestinale di entrambi (Galanis E et al., 2006). In accordo con la classificazione di Tindall (Tindall BJ et al., 2005), ad oggi, sono conosciute due specie, ovvero *Salmonella bongori* e *S. enterica*. Quest'ultima è composta da sei sottospecie e una di queste, *S. enterica* subsp. *enterica*, comprende circa 2000 serovar su circa 2600 di tutto il genere *Salmonella*. Alcuni di questi sono patogeni stretti per l'uomo (*Salmonella Typhi*) e altri invece riguardano solo gli animali (*Salmonella Abortusovis*). Molti serovar di *Salmonella* causano zoonosi e sono patogeni sia per l'uomo, sia per gli animali (LeLièvre V et al., 2019).

Le salmonellosi nell'uomo e negli animali possono essere ampiamente classificate in due gruppi, febbre enterica (tifo) e salmonellosi non tifoidea (NTS) (Langridge et al., 2008) con diverse manifestazioni, quali febbre enterica, gastroenterite, batteriemia, infezione extra-intestinale e stato di portatore sano (Langridge et al., 2008). La maggior parte dei serovar provoca infiammazione localizzata auto-limitante dell'ileo terminale e del colon, nota come gastroenterite, che in alcuni casi necessita di un trattamento antimicrobico (Gal-Mor O, 2019). Questi serovar di *Salmonella* non tifoidea sono anche riconosciuti come 'generalisti' per la loro capacità di colonizzare e infettare diverse specie animali che fungono da riserva ambientale (Gal-Mor O, 2019). Secondo i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) è stato stimato che *Salmonella* non tifoidea sia responsabile di 1,2 milioni di infezioni, 23.000 ricoveri e 450 decessi ogni anno solo negli Stati Uniti (Scallan E et al., 2011; CDC, 2013). Negli ultimi dieci anni, in Europa, annualmente, sono stati registrati tra 87.000 e 135.000 casi di salmonellosi nell'uomo (EFSA ECDC, 2014; Busani L et al., 2018). Nel periodo 2008-2012, è stata osservata una riduzione statisticamente significativa dei casi confermati di salmonellosi umana (riduzione del 35%); tuttavia, nel periodo 2012-2016, il numero di casi non è ulteriormente diminuito. Nel 2016, nell'UE, 9.061 casi umani sono stati associati a 1.067 focolai di

salmonellosi di origine alimentare, che hanno portato al ricovero del 40% delle persone affette e al decesso di 128 soggetti (0,25%) (Busani L et al., 2018). *Salmonella* spp. può essere trasmessa all'uomo attraverso la catena alimentare. Uova e prodotti a base di uova sono un'importante fonte di focolai di salmonellosi di origine alimentare con un tasso di 0,06 su 100.000 abitanti, seguiti da pollame e carne di maiale (0,03 focolai di origine alimentare su 100.000) e formaggio (0,01 focolai di origine alimentare su 100.000) (EFSA & ECDC, 2017). *Salmonella* è sempre più maggiormente riscontrata nei bovini da latte di tutto il mondo (Chlebicz A, Slizewska K, 2018).

Una maggiore prevalenza di *Salmonella* non tifoidea con profilo di AMR è stata osservata tra il 2005-2015 (Crump JA et al., 2015), in particolare con profilo MDR, mostrando resistenza a tre o più classi antimicrobiche (Figueiredo R et al., 2019). Inoltre, in alcuni Paesi europei, sono stati identificati ceppi emergenti MDR di *S. enterica* che presentano determinanti di resistenza ai metalli pesanti (Mourao J et al., 2015). Isolati clinici di *Salmonella* mostrano elevati tassi di resistenza a sulfamidici, tetracicline e ampicillina. Nell'UE, la produzione di ESBL negli isolati di *Salmonella* di origine umana è stata identificata con una frequenza pari a 0,5%, rappresentati con oltre 10 diversi serovar (EFSA & ECDC, 2017). Per quanto riguarda i dati di multiresistenza nell'UE, i tassi più elevati sono stati registrati in *S. Typhimurium* monofasica, che è attualmente il terzo serovar più frequente in Europa nel causare infezione nell'uomo, con 5.770 casi nel 2015, oltre ad essere il secondo più comune nei suini e il primo in termini di multiresistenza (EFSA, 2017a; Florez-Cuadrado D et al., 2018). Molti serovar di *Salmonella*, tra cui Agona, Anatum, Derby, Heidelberg, Infantis, Kentucky, Muenchen, Newport, Schwarzengrund e Typhimurium sono comunemente rilevati negli animali e nei prodotti alimentari e sono associati a infezioni nell'uomo da ceppi resistenti (Pornsukarom S et al., 2018).

## 2.7. Genomica in Sanità Pubblica

Le attività di Sanità Pubblica in ambito di malattie infettive possono essere classificate come indagini epidemiologiche, sorveglianza orientata al controllo delle malattie infettive e sorveglianza orientata alla definizione di strategie da attuare per evitarne l'insorgenza (Struelens MJ, Brisse S, 2013). L'obiettivo principale di un'indagine epidemiologica è quello di identificare le possibili fonti di infezione e di attuare misure di controllo efficaci e appropriate per limitare e/o eliminare il rischio di un'ulteriore diffusione (Van Goethem N et al., 2019). Le indagini sulle epidemie solitamente vengono intraprese dopo un improvviso aumento del numero di casi di infezione, mentre la sorveglianza è la raccolta, l'analisi e la revisione sistematica di dati per la pianificazione, l'implementazione e la valutazione dei programmi di Sanità Pubblica (Van Goethem N et al., 2019).

Negli ultimi decenni, gli epidemiologi hanno fatto passi da gigante nel tracciare la diffusione delle infezioni all'interno e tra le strutture sanitarie integrando studi di epidemiologia classica con differenti metodiche di tipizzazione molecolare. Tra questi, alcuni approcci valutano la struttura (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) o la sequenza (Multilocus Sequence Typing - MLST) del materiale genetico di un microrganismo, al fine di determinare le relazioni tra gli isolati e valutare se essi sono plausibilmente collegati nella trasmissione dell'infezione.

Recentemente, il sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing - WGS) ha migliorato l'epidemiologia molecolare, fornendo uno strumento unico per tutti che supera virtualmente tutti i limiti dei metodi precedenti, come la difficoltà di interpretazione dei dati, la determinazione piuttosto arbitraria dei *cut-off*, l'utilizzo di una tecnica a diverse scale di grandezza, come accade utilizzando l'MLST, che ha un ottimo potere risolutivo a livello globale o regionale, ma è difficilmente applicabile per la determinazione di relazioni clonali all'interno di un unico ospedale. La PFGE, invece, possiede un elevato potere discriminante tanto da rendere difficile il confronto tra patogeni provenienti da regioni geografiche differenti (Hawken SE, Snitkin ES. 2019).

La capacità di analizzare e confrontare interi genomi di patogeni con una maggiore velocità, a costi minori e con un'ampia precisione significa che la genomica sta per essere applicata anche nella microbiologia clinica di routine e nella ricerca per le indagini sui focolai epidemici. Le informazioni riguardanti i microrganismi patogeni ottenute mediante tecniche di genomica possono essere utilizzate nella pratica clinica sia per identificare la causa dell'infezione, sia per valutare la sensibilità agli antibiotici dei patogeni, il che ha permesso di individuare, in tempi brevi, i trattamenti migliori per un tipo di infezione, introducendo queste tecniche come fondamentali per la medicina personalizzata (Johnson SB, Parker M, 2019).

È stato dimostrato che il WGS fornisce una risoluzione sufficiente a chiarire i meccanismi di trasmissione come l'origine, i tempi, la trasmissione e la diffusione della malattia, mentre al tempo stesso produce dati che facilitano il monitoraggio dei patogeni a livello globale (Hawken SE, Snitkin ES, 2019; Ladner JT et al., 2019). Grazie a questi metodi sarà possibile prevedere le pandemie e l'evoluzione dei patogeni, in modo da fronteggiare le emergenze con maggiore consapevolezza (Ladner JT et al., 2019).

Le indagini beneficiano così di una maggiore risoluzione dei dati qual è quella offerta da WGS per l'accertamento dei casi, permettendo di associare i casi alle possibili fonti di infezione, definendo i cluster di trasmissione e fornendo un rapido *feedback* sugli attributi fenotipici chiave (resistotipo: profilo fenotipico di resistenza agli antibiotici) dei patogeni coinvolti. L'applicazione del WGS è, infine particolarmente utile per valutare l'impatto dei programmi di prevenzione e controllo, come campagne di vaccinazione e gestione nell'utilizzo degli antibiotici (Van Goethem N et al., 2019).

Poiché il WGS è diventato il metodo di tipizzazione microbica di riferimento nello studio di *outbreak* è sempre più applicato alla sorveglianza nazionale delle malattie infettive nei Paesi UE/SEE. Inoltre, l'ECDC, nel 2015, durante una consultazione con un team di esperti di ogni settore disciplinare, ha espresso un parere su tale tecnica e formulato una strategia di utilizzo (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/framework-for-genomic-surveillance.pdf>). Grazie ad una migliore valutazione delle dinamiche di trasmissione delle malattie

e della resistenza ai farmaci, verrà migliorata l'accuratezza e l'efficacia della sorveglianza sulle malattie infettive, delle indagini sulle epidemie e della definizione delle politiche di prevenzione.

### **2.7.1. La genotipizzazione degli isolati batterici**

La tipizzazione batterica viene utilizzata per discriminare i ceppi batterici ed è essenziale nelle indagini epidemiologiche, nella sorveglianza e negli studi filogenetici. I primi esperimenti di tipizzazione sono stati condotti attraverso test biochimici i cui risultati erano basati sul fenotipo batterico, come la resistenza agli antibiotici, la suscettibilità nei confronti dei fagi (tipizzazione fagica) e la presenza di antigeni di superficie (sierotipizzazione) (Foxman B et al., 2005). Con l'avvento della biologia molecolare, i metodi di tipizzazione basati sull'analisi del DNA sono stati sempre più utilizzati poiché i risultati di questi protocolli sono riproducibili a causa della natura stabile degli acidi nucleici, oltre ad essere più rapidi e meno laboriosi (Riley LW, 2018).

#### **2.7.1.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

La PFGE o elettroforesi su gel in campo pulsato è una metodologia di tipizzazione molecolare sviluppata da Schwartz e Cantor nel 1984 ed è considerata un approccio molecolare di terza generazione per la tipizzazione batterica (Goering RV, 2010). Essa consente di separare miscele di molecole di DNA grandi di 20 kb fino a 5 Mb su gel di agarosio, riducendo il divario tra la risoluzione dell'elettroforesi convenzionale (0,1-30 kb) e i metodi citogenetici (>5 Mb). Tutte le analisi molecolari dalla prima alla terza generazione richiedono l'uso dell'elettroforesi su gel di agarosio per separare i frammenti di DNA plasmidico o genomico dopo la restrizione enzimatica (Lopez-Canovas L et al., 2019). L'identificazione di cluster epidemici si basa sull'analisi di profili costituiti da varie

bande di DNA. Come innovazione rispetto ad un approccio di prima e seconda generazione, è presente il movimento e la separazione dei frammenti del genoma che, oltre a dipendere dalle dimensioni molecolari di ciascun frammento limitato, nella PFGE si basa anche sul riorientamento periodico pulsato dei campi elettroforetici (Goering RV, 2010). Poiché i genomi batterici hanno una dimensione di 2-4 Mbp, l'elettroforesi pulsata consente una più chiara separazione dei frammenti di DNA di varie dimensioni (da kb a Mb), con una conseguente maggiore risoluzione nella tipizzazione (Neoh H et al., 2019). La PFGE permette l'analisi di un *fingerprinting*, che rappresenta i cambiamenti/mutazioni nei siti di riconoscimento dell'endonucleasi (che porta alla perdita o all'acquisizione di siti di restrizione). Pertanto, tali informazioni possono essere utilizzate per indagini di correlazione genetica a livello di ceppo. Sono state proposte linee guida per l'interpretazione dei modelli di restrizione generati da PFGE, definiti come criteri di Tenover (Tenover et al., 1995). I ceppi sono considerati geneticamente 'indistinguibili' se i profili di PFGE mostrano lo stesso numero e dimensione dei frammenti di DNA. Sono considerati 'strettamente correlati' se i profili di PFGE differiscono da un ceppo di riferimento da cambiamenti coerenti con un singolo evento genetico (differenza di 2 o 3 bande). Se i pattern PFGE differiscono per 4 fino a 6 bande, si ritiene che abbiano subito due eventi genetici indipendenti e quindi siano 'possibilmente correlati'. Se i ceppi hanno differenze di banda >6 rispetto a un modello di riferimento, essi sono considerati 'diversi' e geneticamente non correlati (Riley LW et al., 2018). Nonostante il suo ampio utilizzo, la PFGE è un metodo laborioso a causa della preparazione del campione, del lungo periodo di tempo di corsa e della dipendenza dalla coltura batterica, in quanto il protocollo prevede l'utilizzo di intere colonie, precedentemente coltivate, da sottoporre a trattamento con buffer e proteinasi e successivamente a digestione enzimatica (Quainoo S et al., 2017). La PFGE può essere utilizzata per la tipizzazione molecolare di qualsiasi organismo batterico coltivabile senza una conoscenza preliminare delle sequenze di DNA ed è più discriminante rispetto ad altri test basati sull'elettroforesi (Riley LW et al., 2018).

### 2.7.1.2. MultiLocus Sequence Typing (MLST)

La metodica MLST, proposta nel 1998, è basata sul sequenziamento genico per identificare le relazioni clonali tra diversi batteri. Questa tecnica si pone l'obiettivo di tipizzare i microrganismi escludendo dall'analisi i determinanti genici che possono essere acquisiti da un batterio mediante trasformazione o trasferimento orizzontale. Quindi, prevede l'analisi di geni conservati denominati 'housekeeping' e utilizza come unità di confronto gli alleli, piuttosto che le sequenze di nucleotidi. Ogni cambiamento allelico viene conteggiato come un singolo evento genetico, indipendentemente dal numero di polimorfismi nucleotidici coinvolti (Maiden M et al., 2013). Nella maggior parte degli schemi utilizzati di MLST, vengono indicizzati sette 'loci MLST'. Viene assegnato un numero di allele univoco per ciascun locus con una sequenza univoca. La combinazione degli alleli per ciascuno dei loci caratterizzano il profilo allelico (ad esempio, 2-3-4-3-8-4-6), generando quindi un Sequence Type (ST), anch'esso definito e caratterizzato da un numero disponibile da un ampio database (ad esempio, ST11). ST e sequenze alleliche sono correlate ai rispettivi profili nei database di MLST (PubMLST database collection) e ciascun ST riassume le informazioni di migliaia di coppie di basi di DNA. Il dato relativo all'assegnazione dell'ST può essere, quindi, utilizzato come un codice a barre per differenziare gli isolati e per stabilire relazioni evolutive tramite strumenti di analisi specifici (Maiden M et al., 2013). Sebbene un ST rappresenti solo una piccola percentuale delle parti 'conservate' del genoma analizzato, la grande varietà in termini di ST diversi in molte specie batteriche dimostra l'importanza come mezzo di confronto dei dati. Ciononostante, questa tecnica non è in grado di mostrare relazioni inter-specie; di conseguenza, anche nello stesso genere batterico è necessario utilizzare diversi schemi di MLST; allo stesso tempo, non è sufficientemente discriminante per distinguere singoli cloni appartenenti alla stessa *lineage* (Jolley KA et al., 2012).



### 2.7.1.3. Whole Genome Sequencing (WGS)

WGS è anche definito il sequenziamento dell'intero genoma. Ciò è reso possibile grazie alle nuove tecniche di 'Next Generation Sequencing' (NGS), che permettono di ottenere un gran numero di dati in breve tempo e a costi relativamente bassi (Harris S et al., 2013; Deurenberg R et al., 2017). L'applicazione del WGS è ampia e può spaziare dal sequenziamento del genoma umano, trovando spazio nella medicina personalizzata, fino al sequenziamento di microorganismi, per comprenderne filogenesi, modalità di trasmissione, profili di resistenza e appartenenza ad eventi epidemici. Il sequenziamento dell'intero genoma può essere utilizzato nella routine di lavoro di laboratorio nel caso in cui sia richiesta la tipizzazione di agenti patogeni mediante un metodo con il più alto potere discriminante, ad esempio nelle indagini di focolai epidemici in ambito ospedaliero (Zhou K et al., 2016). Il WGS di genomi batterici può essere usato anche per rivelare la presenza di geni di AMR o geni associati a virulenza e patogenicità, che talvolta non vengono espressi *in vitro*, ma soltanto *in vivo* (Quainoo S et al., 2017), nonché per identificare nuovi meccanismi di patogenicità e resistenza (Ferdous M et al., 2016). Inoltre, il sequenziamento di nuova generazione consente di effettuare anche studi di metagenomica tramite l'identificazione coltura-indipendente degli agenti patogeni in campioni complessi, compresi campioni clinici, ambientali e alimentari, consentendo anche l'identificazione di *taxa* esigenti e difficili da coltivare (Sabat AJ et al., 2017).

In diversi Paesi, come Stati Uniti, Danimarca, Regno Unito, Germania e Paesi Bassi, la genotipizzazione di batteri patogeni basata sull'uso di WGS è già in fase di sperimentazione per l'implementazione come strumento di routine per il monitoraggio e il rilevamento di ceppi MDR (Pecora N et al., 2015), nonché per l'identificazione tempestiva di focolai epidemici (Joensen K et al., 2015; Eyre DW et al., 2015). La tipizzazione basata su WGS di agenti patogeni include elementi genetici mobili e fornisce una risoluzione senza precedenti nel discriminare anche linee genetiche altamente correlati e potrebbe evitare l'uso di protocolli univoci per una sola specie.

### 3. Obiettivi

L'utilizzo eccessivo ed inadeguato di antibiotici in tutti i settori, ovvero in medicina umana e veterinaria e in zootecnia, è considerato una delle principali cause della diffusione di microrganismi MDR. Quando l'AMR insorge nella flora batterica di animali, essa, attraverso il cibo e l'acqua, può diffondersi al comparto umano e può compromettere l'efficacia delle terapie, raggiungendo anche l'ambiente nosocomiale. L'AMR è, quindi, un problema di dimensioni globali, che può essere contrastato solo con un approccio di tipo '*One Health*', che ha il principale obiettivo di preservare la salute globale.

Tra i patogeni umani con spiccata resistenza agli antibiotici, gli Enterobatteri sono motivo di preoccupazione a livello mondiale, poichè mostrano una elevata resistenza soprattutto ai carbapenemi, antibiotici di ultima linea (Ripabelli G et al., 2018). La perdita di efficacia di questa classe di antibiotici lascia, infatti, uno scarso margine di intervento terapeutico e richiede il ricorso ad antibiotici ritenuti, fino a poco tempo fa, desueti, come la colistina. Tuttavia, sono state già riportate numerose evidenze di ceppi resistenti anche a questo farmaco (Cannatelli A et al., 2014; Esposito EP et al., 2018). Secondo i dati del Report dell'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) del 2017, l'Italia è, insieme alla Grecia, tra i Paesi con i tassi di resistenza ai carbapenemi in *K. pneumoniae* più elevati rispetto alla media europea. Tale microrganismo è, insieme ad *A. baumannii*, incluso tra i cosiddetti batteri '*ESKAPE*', conosciuti per la loro spiccata multiresistenza agli antibiotici che causano soprattutto infezioni nel contesto ospedaliero. Ogni anno si verificano in Italia 450-700 mila ICA (soprattutto infezioni urinarie, seguite da infezioni della ferita chirurgica, polmoniti e sepsi). Di queste, si stima che circa il 30% siano potenzialmente prevenibili (135-210 mila) e che siano direttamente causa del decesso nell'1% dei casi (1350-2100) (<https://www.epicentro.iss.it/>). Pertanto, comprendere il loro impatto è essenziale

per sviluppare adeguate strategie di controllo anche mediante l'introduzione di un piano di sorveglianza nazionale per ridurre l'incidenza (Ripabelli G et al., 2019).

La resistenza agli antibiotici si diffonde velocemente. Spesso, i geni codificanti per i determinanti di resistenza acquisiti dai batteri sono associati a elementi genetici mobili che mediano il loro scambio tra agenti patogeni e commensali (Beatson SA, Walker MJ, 2014). Pertanto, il contesto genetico in cui è inserito un gene di resistenza agli antibiotici può riflettere la sua mobilità all'interno della popolazione batterica. È di estrema necessità monitorare la loro presenza negli isolati clinici, per comprenderne il contesto genetico e per delinearne e prevederne i percorsi di diffusione.

In Italia, i ceppi di *Salmonella* spp. presentano resistenza a tetraciclina (45,2%), streptomina (40,1%), sulfamidico (39,9%) e ampicillina (41,5%), mentre la resistenza nei confronti di farmaci più recenti (fluorochinoloni e cefalosporine) appare ancora bassa (Epicentro.iss.it).

In tale scenario, riveste un ruolo senza dubbio cruciale la sorveglianza epidemiologica che, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, è un "*esercizio di continuo scrutinio e di vigilanza sulla distribuzione e diffusione delle infezioni e dei fattori ad esse correlati, di sufficiente completezza ed accuratezza da essere pertinente per un controllo efficace*" (Salute M, 2019).

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo lo studio dell'antibiotico-resistenza e, in particolare, la caratterizzazione biomolecolare di batteri resistenti, isolati sia nel contesto ospedaliero, sia nel contesto alimentare. In dettaglio, gli obiettivi del lavoro di tesi sono stati quelli di:

- caratterizzare, mediante antibiogramma, gli isolati batterici in base al profilo di resistenza (resistotipo) e determinazione della concentrazione minima inibente per diversi antibiotici;
- determinare, mediante PCR, la prevalenza dei determinanti genici, codificati da plasmidi, implicati nella resistenza ai carbapenemi e ai beta-lattamici (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* per *K. pneumoniae* e *A. baumannii*; *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* e *bla<sub>OXA-58</sub>* solo per *A. baumannii*; alla colistina (varianti *mcr-1-8*) per *K. pneumoniae*;

- valutare, attraverso il sequenziamento con metodo Sanger, previa amplificazione del gene target, la presenza di mutazioni nel gene cromosomale *mgrB*, coinvolto nella resistenza alla colistina, estendendo successivamente l'analisi anche alle sequenze amminoacidiche;
- determinare, mediante PCR, la presenza dei geni codificanti per le pompe di efflusso coinvolte nei meccanismi di resistenza verso numerosi antibiotici (*adeB*, *adeG*, *adeJ*, *abeS*, *craA*, *abeM*, *soxR*);
- analizzare, attraverso PFGE, le relazioni clonali esistenti tra i ceppi ed individuare la presenza di cluster epidemici per *A. baumannii* e *K. pneumoniae*;
- descrivere, mediante MLST, la distribuzione dei cloni circolanti ed emergenti per un confronto con i dati a livello nazionale ed internazionale.

Durante il periodo di studio svolto presso i laboratori di Food Water and Environmental Microbiology (FW&E) e Gastrointestinal Bacterial Reference Unit (GBRU) del Public Health England (Colindale, Londra, Regno Unito), sono stati, inoltre, analizzati i dati relativi a ceppi di *S. enterica* non tifoidea ottenuti mediante WGS, che permette di ottenere informazioni complete sui geni contenuti in un determinato organismo. Gli obiettivi specifici di questa parte del lavoro sono stati quelli di:

- determinare, mediante l'analisi di un ampio *dataset*, la prevalenza di *S. enterica* non tifoidea in alimenti, mangimi, acqua e campioni ambientali;
- analizzare la distribuzione degli isolati e dei diversi serovar nei campioni di differente origine e provenienza geografica;
- esaminare i dati di WGS in un sottoinsieme di isolati provenienti da Regno Unito, Thailandia e Brasile per stabilire la prevalenza dei determinanti genetici implicati nella resistenza a carbapenemi, beta-lattamici, aminoglicosidi, fluorochinoloni, macrolidi, sulfametossazolo e tetracicline.

Lo studio ha, quindi, l'obiettivo finale di generare spunti per implementare strategie di contrasto del fenomeno dell'AMR e stimoli per le ricerche future da intraprendere con un approccio 'One Health'.

## 4. Materiali e Metodi

### 4.1. La resistenza agli antibiotici nel contesto ospedaliero

#### 4.1.1. Isolamento e selezione di ceppi di *K. pneumoniae* e *A. baumannii*

Nello studio dell'antibiotico-resistenza in patogeni umani isolati nel *setting* ospedaliero, sono stati analizzati 26 ceppi di *K. pneumoniae* (Tabella 1) e 24 di *A. baumannii* (Tabella 2), i quali sono stati raccolti nell'ambito del Sistema di sorveglianza di 'Alert organisms' attivato presso il Presidio Ospedaliero "A. Cardarelli" di Campobasso, Molise, Italia. I ceppi di *K. pneumoniae* sono stati isolati nel periodo 2014-2017, mentre quelli di *A. baumannii* fanno riferimento al 2010. Nello studio di *K. pneumoniae*, sono stati inclusi isolati non replicati e che hanno presentato un fenotipo KPC. Le colture sono state ottenute soprattutto da campioni di broncoaspirato (n=9, 35,0%), urine (n=6, 23%), tampone rettale (n=4, 15,4%) ed emocoltura (n=3, 11,5%) da pazienti di età media pari a 73±12,6 anni (mediana 78,5 - range 44-89 anni). Quindici (57,7 %) isolati provenivano da pazienti ricoverati nell'Unità di Terapia Intensiva (UTI): nel 60% dei casi da pazienti di genere maschile.

I ceppi di *A. baumannii* erano provenienti da pazienti ricoverati in UTI, ad eccezione di un isolato dal reparto di Nefrologia del Presidio Ospedaliero. Anche in questo caso, i ceppi sono stati isolati principalmente da pazienti di genere maschile (n=15, 62,5%) e da broncoaspirato (n=22, 91,6%), seguito da urine (n=1, 4,2%) e tampone di nefrostomia (n=1, 4,2%).

Tutti gli isolati sono stati purificati presso i Laboratori della Cattedra di Igiene dell'Università degli Studi del Molise e coltivati su piastre di McConkey agar (Biolife, Milano, Italy), successivamente incubate a 37°C overnight.

**Tabella 1:** Caratteristiche dei pazienti e dei ceppi di *K. pneumoniae* isolati presso il Presidio Ospedaliero ‘A. Cardarelli’ di Campobasso

<b>CODICE</b>	<b>DATA PRELIEVO</b>	<b>ETÀ</b>	<b>SESSO</b>	<b>CAMPIONE</b>	<b>REPARTO</b>
<b>KP3</b>	16/08/2014	85	M	Emocoltura	Medicina
<b>KP4</b>	18/08/2014	79	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP5</b>	30/10/2014	63	M	Urine	UTI
<b>KP6</b>	20/10/2014	40	F	Urine	Urologia
<b>KP7</b>	19/11/2014	75	M	Liquido protesico	Ortopedia
<b>KP8</b>	17/11/2014	84	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP9</b>	09/12/2014	76	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP10</b>	14/12/2014	70	M	Emocoltura	Malattie infettive
<b>KP11</b>	15/12/2014	63	M	Emocoltura	Urologia
<b>KP12</b>	05/01/2015	85	F	Urine	UTI
<b>KP14</b>	05/01/2015	74	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP18</b>	12/01/2015	75	F	Broncoaspirato	UTI
<b>KP19</b>	12/01/2015	81	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP25</b>	25/01/2016	56	M	Ulcera	Diabetologia
<b>KP27</b>	01/02/2016	60	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP28</b>	29/02/2016	59	M	Urine	UTI
<b>KP29</b>	02/03/2016	71	F	Tampone rettale	UTI
<b>KP31</b>	11/09/2016	50	M	Tampone rettale	UTI
<b>KP32</b>	20/02/2017	82	F	Urine	Malattie infettive
<b>KP34</b>	06/03/2017	56	M	Broncoaspirato	UTI
<b>KP36</b>	03/04/2017	78	F	Broncoaspirato	UTI
<b>KP39</b>	09/11/2017	58	F	Stent	Nefrologia
<b>KP40</b>	06/11/2017	59	F	Urine	Nefrologia
<b>KP41</b>	07/11/2017	78	M	Cisti protesica	Ortopedia
<b>KP42</b>	07/11/2017	87	M	Tampone rettale	UTI
<b>KP43</b>	19/12/2017	57	M	Tampone rettale	UTI

**Tabella 2:** Caratteristiche dei pazienti e dei ceppi di *A. baumannii* isolati presso il Presidio Ospedaliero ‘A. Cardarelli’ di Campobasso

<b>CODICE</b>	<b>DATA PRELIEVO</b>	<b>ETÀ</b>	<b>SESSO</b>	<b>CAMPIONE</b>	<b>REPARTO</b>
AC1	19/04/2010	78	F	Broncoaspirato	UTI
AC2	17/05/2010	53	M	Broncoaspirato	UTI
AC3	03/06/2010	90	M	Tampone nefrostomia	Nefrologia
AC4	07/06/2010	90	F	Broncoaspirato	UTI
AC5	14/06/2010	77	F	Broncoaspirato	UTI
AC6	14/06/2010	79	F	Broncoaspirato	UTI
AC7	12/07/2010	74	M	Broncoaspirato	UTI
AC8	12/07/2010	50	M	Broncoaspirato	UTI
AC11	02/08/2010	65	M	Urine	UTI
AC12	02/08/2010	80	M	Broncoaspirato	UTI
AC14	23/08/2010	30	M	Broncoaspirato	UTI
AC15	27/09/2010	58	F	Broncoaspirato	UTI
AC16	27/09/2010	49	M	Broncoaspirato	UTI
AC19	04/10/2010	74	F	Broncoaspirato	UTI
AC20	04/10/2010	69	M	Broncoaspirato	UTI
AC22	18/10/2010	74	F	Broncoaspirato	UTI
AC25	25/10/2010	45	M	Broncoaspirato	UTI
AC27	25/10/2010	84	M	Broncoaspirato	UTI
AC28	02/11/2010	88	F	Broncoaspirato	UTI
AC29	02/11/2010	57	M	Broncoaspirato	UTI
AC30	02/11/2010	75	F	Broncoaspirato	UTI
AC33	02/11/2010	42	M	Broncoaspirato	UTI
AC38	29/11/2010	52	M	Broncoaspirato	UTI
AC39	29/11/2010	87	M	Broncoaspirato	UTI

#### 4.1.2 Test di suscettibilità agli antibiotici

La valutazione della suscettibilità agli antibiotici è stata effettuata in collaborazione con i Laboratori di microbiologia del Presidio Ospedaliero “A. Cardarelli” usando BD Phoenix™ Automated Microbiology System (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, United States), che ha permesso di valutare la concentrazione minima inibente (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) di ciascun antibiotico. Gli antibiotici testati per *K. pneumoniae* e *A. baumannii* sono indicati nella (Tabella 3).

Inoltre, nei ceppi di *K. pneumoniae*, per la determinazione della MIC per la colistina in *K. pneumoniae* è stato usato il metodo della microdiluizione. I risultati sono stati interpretati seguendo le linee guida dell’European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, European committee on antimicrobial susceptibility testing, 2019).

È da sottolineare che non tutti i ceppi sono stati testati per lo stesso panel di antibiotici; pertanto, la suscettibilità ad essi è stata espressa in percentuale in relazione al numero dei ceppi per i quali ne è stata valutata la suscettibilità verso un antibiotico.



**Tabella 3:** Antibiotici testati per la determinazione della MIC

ANTIBIOTICO	Numero di ceppi testati	Numero di ceppi testati
	di <i>K. pneumoniae</i>	di <i>A. baumannii</i>
<b>Imipenem</b>	26/26	24/24
<b>Meropenem</b>	26/26	24/24
<b>Ertapenem</b>	26/26	0/24
<b>Aztreonam</b>	0/26	24/24
<b>Ampicillina</b>	26/26	20/24
<b>Amoxicillina-clavulanato</b>	26/26	24/24
<b>Piperacillina</b>	26/26	15/24
<b>Piperacillina-tazobactam</b>	26/26	24/24
<b>Ceftazidime</b>	26/26	0/24
<b>Cefazolina</b>	0/26	13/24
<b>Cefoxitina</b>	0/26	18/24
<b>Cefuroxime</b>	26/26	0/24
<b>Cefotaxime</b>	26/26	23/24
<b>Amikacina</b>	26/26	24/24
<b>Gentamicina</b>	26/26	24/24
<b>Ciprofloxacina</b>	26/26	24/24
<b>Levofloxacina</b>	26/26	24/24
<b>Fosfomicina</b>	26/26	0/24
<b>Cloramfenicolo</b>	26/26	14/24
<b>Trimetoprim</b>	0/26	24/24
<b>Trimetoprim-sulfametossazolo</b>	26/26	0/24
<b>Tigeciclina</b>	26/26	0/24
<b>Tobramicina</b>	26/26	0/24
<b>Colistina</b>	26/26	23/24
<b>Tetraciclina</b>	0/26	15/24

### 4.1.3 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto utilizzando Maxwell® 16 Cell DNA Purification (Promega, Milan, Italy) mediante il kit di purificazione Cell Purification Cat#AS1010. Il metodo permette l'estrazione simultanea di 16 campioni in soli 40 minuti, sfruttando le capacità della silice di adsorbire il materiale genetico.

Il protocollo di estrazione ha previsto diverse fasi:

- lisi del campione;
- legame degli acidi nucleici a particelle di silice magnetizzata;
- separazione delle particelle legate da altri componenti cellulari;
- eluizione degli acidi nucleici da utilizzare per successive analisi.

#### Fase di lisi cellulare

La sospensione batterica è stata sottoposta a lisi prima dell'estrazione. È stato, quindi, effettuato il prelievo di un'ansata di patina microbica da piastre di Trypton Soy Agar (TSA), precedentemente incubate overnight, in seguito risospesa in 300 µl di soluzione, contenente 260 µl di Buffer di lisi L6 (Tiocianato Guanidina + TRIS HCl pH 6.4 0,1M, EDTA 0,2M pH 8, Triton) e 40 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) (IBI Shelton Scientific, Milano). Successivamente, la sospensione è stata incubata a 65°C per 10 minuti. Per la lisi completa della membrana esterna, la sospensione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e centrifugata a 12.000 rpm per 1 minuto.

#### Fase di estrazione degli acidi nucleici

Il protocollo di estrazione in base al Maxwell 16® Instrument Technical Manual prevede di posizionare le cartucce disponibili per l'estrazione, una per ciascun ceppo, su un rack numerato, per poi rimuovere il sigillante ed eseguire le seguenti operazioni:

- trasferire la sospensione ottenuta dalla fase di lisi (circa 300 µl) nel pozzetto #1 della cartuccia, contrassegnato da un codice identificativo;

- posizionare un pistone (“*plunger*”) nel pozzetto #7 di ciascuna cartuccia;
- accendere lo strumento e usare il cursore “*Run*” per effettuare una corsa di purificazione e selezionare il metodo e il tipo di campione da cui estrarre il DNA (Cell in questo caso);
- aprire lo sportello dello strumento e premere “*Run/Stop*” per estendere la piattaforma verso l’esterno, al fine di posizionare correttamente le cartucce, ciascuna contenente un pistone;
- in ogni postazione, numerata da 1 a 16, predisporre un tubo di eluizione, contenente 300  $\mu$ l del Buffer di eluizione, incluso nel kit;
- premere “*Run/Stop*” per permettere alla piattaforma di ritrarsi verso l’interno e chiudere lo sportello per permettere l’inizio del processo di estrazione.

Quando la purificazione è stata completata, il monitor LCD mostra un messaggio per indicare che il processo è terminato e quindi:

- premere “*Run/Stop*” per portare in avanti la piattaforma dello strumento;
- rimuovere i tubi di eluizione dalla piattaforma dello strumento e posizionarli nel rack magnetico, che permette di far precipitare le particelle sul fondo del tubo;
- trasferire i campioni da ciascun tubo di eluizione in tubi sterili;
- rimuovere le cartucce ed i pistoni ed eliminarli.

#### **4.1.4. Ricerca di geni implicati nella resistenza ai carbapenemi**

Nei ceppi di *K. pneumoniae*, è stata effettuata la ricerca dei principali geni coinvolti nella resistenza ai carbapenemi, quali *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> mediante saggi di PCR utilizzando primer specifici (Tabella 4), come precedentemente riportato (Dallenne C et al., 2010; Nordmann P et al., 2011). L’amplificazione è stata effettuata in reazioni dal volume finale di 25  $\mu$ l utilizzando 2  $\mu$ l di DNA, 1X Master Mix (Promega Corporation) e primers (Eurofins Genomics, srl,

Ebersberg, Germany) utilizzati alla concentrazione di 1  $\mu$ M. I geni target sono stati amplificati usando le seguenti condizioni: 94°C per 2 min; 35 cicli: 94°C per 1 min, 45°C (*bla<sub>IMP</sub>*)/52°C (*bla<sub>KPC</sub>*)/54°C (*bla<sub>GES</sub>*)/56°C (*bla<sub>VIM/OXA-48</sub>*)/60°C (*bla<sub>NDM-1</sub>*) per 40 sec, 72°C per 1 min; 72°C per 5 min. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (alla concentrazione di 1-1,5% m/v, TAE buffer 1X a 100 V per 1 h), includendo il ladder di DNA (Promega) da 100 bp. In ogni reazione è stato incluso un controllo negativo e un controllo positivo.

È stata, inoltre, valutata la presenza dei geni *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* codificanti per le ESBL mediante saggi di multiplex-PCR, usando oligonucleotidi specifici (Tabella 4), come riportato precedentemente (Ghasemi Y et al., 2013). I prodotti di PCR sono stati visualizzati dopo elettroforesi su gel di agarosio (concentrazione 1-1,5% m/v, TAE buffer 1X a 100 V per 1 h), includendo in ogni reazione ladder di DNA di 100 bp (Promega), un controllo positivo e un controllo negativo.

Nei ceppi di *A. baumannii*, la presenza di geni codificanti per le principali carbapenemasi (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* e *bla<sub>OXA-58</sub>*) (Tabella 5) e di quelli codificanti per le pompe di efflusso coinvolte nei meccanismi di resistenza verso numerosi antibiotici (*adeB*, *adeG* e *adeJ*, *abeS*, *craA*, *abeM*, *soxR*) è stata valutata mediante saggi di PCR (Tabella 6). Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 25  $\mu$ l contenente 2  $\mu$ l di DNA, 1X Master Mix (Thermo Fisher PCR Master Mix 2X), primers (Tabelle 5-6) utilizzati ad una concentrazione variabile (0,5  $\mu$ M per *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM-1</sub>*, 2  $\mu$ M per *abeM* e *abeS*, 1  $\mu$ M per tutti gli altri geni) e acqua per portare a volume.

**Tabella 4:** Primer utilizzati per la ricerca di geni codificanti per le carbapenemasi e le ESBL nei ceppi di *K. pneumoniae*

	Gene target	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
<b>Carbapenemasi classe A</b>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	F: CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC R: ACGACGGCATAGTCATTTGC	538 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>GES</sub></i>	F: AGTCGGCTAGACCGGAAAG R: TTTGTCCGTGCTCAGGAT	399 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	F: GATGGTGTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390 bp	Dallenne C et al., 2010
<b>Carbapenemasi classe B</b>	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	F: TTGACACTCCATTTACDG R: GATYGAGAATTAAGCCACYCT	139 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	F: GGGCAGTCGCTTCCAACGGT R: GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	475 bp	Shenoy KA et al., 2014
<b>Carbapenemasi classe D</b>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	F: GCTTGATCGCCCTCGATT R: GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281 bp	Chaudhary M, Anurag P, 2014
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F: TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445 bp	Ghasemi Y et al., 2013
<b>ESBL</b>	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593 bp	Ghasemi Y et al., 2013
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F: TCTCCCTGTTAGCCACCCTG R: CCACTGCAGCAGCTGC(A/C)GTT	973 bp	Ghasemi Y et al., 2013

Dopo l'amplificazione, è stata effettuata l'elettroforesi su gel di agarosio (concentrazione 1,5%-2,5% in base al peso molecolare del prodotto di PCR) in Buffer TAE 1X (Bio-Rad), impostando 100 V e 400 mA per 80 minuti. Per ogni corsa elettroforetica, è stato incluso un ladder di 100 bp (Thermo Fisher GeneRuler DNA Ladder 100 bp), tranne per il gene *abeS* per il quale è stato utilizzato il marker di 20 bp (Thermo Fisher GeneRuler DNA Ladder 20 bp).

**Tabella 5:** Primer utilizzati per la ricerca di geni codificanti per le carbapenemasi,  $\beta$ -lattamasi e ESBL in *A. baumannii*

	Gene	Sequenza (5'- 3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
<b>ESBL</b>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F: CGCCTGTGTATTATCTCCCT R: CGAGTAGTCCACCAGATCCT	293 bp	Bali EB et al., 2010
<b>Carbapenemasi classe A</b>	<i>bla<sub>KPC</sub> (1-5)</i>	F: CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC R: ACGACGGCATAGTCATTTGC	538 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>GES</sub> (1-9, 11)</i>	F: AGTCGGCTAGACCGGAAAG R: TTTGTCCGTGCTCAGGAT	399 bp	Dallenne C et al., 2010
<b>Carbapenemasi classe B</b>	<i>bla<sub>IMP</sub> (9,16,18, 22 e 25)</i>	F: TTGACACTCCATTTACDG R: GATYGAGAATTAAGCCACYCT	139 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>VIM</sub> (1-2)</i>	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390 bp	Dallenne C et al., 2010
	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	F: GGGCAGTCGCTTCCAACGGT R: GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	475 bp	Shenoy KA et al., 2014
	<i>bla<sub>GIM</sub></i>	F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTTGCCATGC	477 bp	Safari M et al., 2015
<b><math>\beta</math>-lattamasi</b>	<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	F: CGACAGCAGGTGGAT R: GGTAAAGGTTGGCATG	510 bp	Zhang T et al., 2017
<b>Carbapenemasi classe D</b>	<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTCTGACCGCATTTCAT	501 bp	Qi C et al., 2007
	<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246 bp	Qi C et al., 2007
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353 bp	Shamsizadeh Z et al., 2017
	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	F: AAGTATTGGGGCTTGTGCTG R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599 bp	Shamsizadeh Z et al., 2017

**Tabella 6:** Primer utilizzati per la ricerca di geni codificanti per le pompe di efflusso in *A. baumannii*

Famiglia	Gene	Sequenze (5'- 3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
<b>RND</b>	<i>adeB</i>	F: CTTGCATTTACGTGTGGTGT	168 bp	Coyne S et al., 2010
		R: GCTTTTCTACTGCACCCAAA		
	<i>adeG</i>	F: GCGTTGCTGTGACAGATGTT	104 bp	Nowak J et al., 2015
		R: TTGTGCACGGACCTGATAAA		
	<i>adeJ</i>	F: GGTCATTAATATCTTTGGC	221 bp	Fernandez-Cuenca S et al., 2015
		R: GGTACGAATACCGCTGTCA		
<b>SMR</b>	<i>abeS</i>	F: TTTGGTCAGGCGCAGGTATT	86 bp	Li H et al., 2017
		R: ACCAATGCAGGCAGCTAAGT		
<b>MFS</b>	<i>craA</i>	F: TTCATTGCTTGCGCCTTT	125 bp	Rumbo C et al., 2013
		R: CCAGTGCCATGAAACATAATCA		
<b>MATE</b>	<i>abeM</i>	F: AGGGACGTATTATGGCGAAA	165 bp	Rumbo C et al., 2013
		R: CTGCTGTGCTTAGACCAATTTTT		
	<i>soxR</i>	F: ATGGATATTGGTGAAGTCG	405 bp	Li H et al., 2017
		R: TTAAAGTTTTGTTGGCTGAT		

#### 4.1.5. Caratterizzazione molecolare della resistenza alla colistina in *K. pneumoniae*

Nei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alla colistina (col-R) è stata effettuata, mediante saggi di PCR, la ricerca di geni codificati da plasmidi: *mcr-1* (Barbieri NL et al., 2017), *mcr-2* (Xavier B et al., 2016), *mcr-3* (Yin W et al., 2017), *mcr-4* (Carattoli A et al., 2017), *mcr-5* (Borowiak M et al., 2017), *mcr-6* (Wang X et al., 2018), *mcr-7* (Yang YQ et al., 2018), *mcr-7.1* (Yang YQ et al., 2018) e *mcr-8* (Wang X et al., 2018). Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 25 µl con 2 µl di DNA, 1X Master Mix (Promega Corporation) e primers alla concentrazione di 1 µM. Gli ampliconi sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (concentrazione 1-1,5% m/v, TAE buffer 1X a 100 V per 1 h), usando un ladder di DNA (Promega) da 100 bp. In ogni reazione è stato incluso un controllo negativo e un controllo positivo (Tabella 7).

L'analisi del gene cromosomale *mgrB* è stata effettuata utilizzando la coppia di primer *mgrB\_Ext\_F* e *mgrB\_Ext\_R* per l'amplificazione del gene target e di alcune regioni fiancheggianti il gene (ottenendo un amplicone di 253 bp), come riportato (Cannatelli A et al., 2014). L'amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 50 µl usando 5 µl di DNA template, 1X Master Mix (Promega Corporation) e primers alla concentrazione di 1 µM (Tabella 7).

In ogni reazione, sono stati inclusi i controlli negativi, rappresentati da ceppi sensibili alla colistina (col-S). I prodotti di PCR sono stati inizialmente analizzati mediante visualizzazione in elettroforesi su gel di agarosio (1,5% m/v concentrazione, 1X TAE buffer a 100 V for 1 h) utilizzando un marker da 100 bp DNA (Promega). La presenza di ampliconi con un peso molecolare superiore all'atteso (253 bp) ha suggerito la presenza di una Sequenza di Inserzione (*IS*) nel gene. Quindi, gli ampliconi relativi ai ceppi col-R sono stati sottoposti a sequenziamento di Sanger (Eurofins Genomics, srl, Ebersberg, Germany), includendo anche ceppi col-S come controllo. Le sequenze sono state analizzate mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e processate con BioEdit v7.0.5., al fine di valutare la presenza di mutazioni puntiformi all'interno del gene.

Per tradurre le sequenze di DNA ottenute è stato utilizzato EMBOSS Transeq (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss>). Le sequenze proteiche ottenute sono state sottoposte a successive analisi mediante Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) che, grazie ad un algoritmo studiato sulla funzionalità proteica, permette di determinare l'impatto delle mutazioni sulla proteina stessa attraverso il calcolo di uno *score* o 'punteggio' per ogni mutazione segnalata (Choi et al., 2012). Gli *score* di PROVEAN sono calcolati in base a sequenze omologhe raccolte in un database. Per ottimizzare la capacità predittiva di PROVEAN, è stato scelto un valore di *cut-off* dello *score* pari a 2,5 per consentire una migliore separazione tra le mutazioni deleterie e quelle neutrali. La variazione dello *score* di allineamento è stata considerata come misura della variazione di somiglianza causata dalla mutazione, permettendo di determinare la funzionalità delle proteine dopo aver accumulato una o più mutazioni.



**Tabella 7:** Primer usati per la ricerca di geni associati alla resistenza alla colistina in *K. pneumoniae*

Gene	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
<i>mcr-1</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG	1626 bp	Barbieri NL et al., 2017
<i>mcr-2</i>	F: TGGTACAGCCCCCTTATT R: GCTTGAGATTGGGTTATGA	16117 bp	Xavier B et al., 2016
<i>mcr-3</i>	F: TTGGCACTGTATTTTGCATTT R: TTAACGAAATTGGCTGGAACA	542 bp	Yin W et al 2017
<i>mcr-4</i>	F: ATTGGGATAGTCGCCTTTTT R: TTACAGCCAGAATCATTATCA	1820 bp	Carattoli A et al., 2017
<i>mcr-5</i>	F: ATGCGGT TGTCTGCATTTATC R: TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	1644 bp	Borowiak M et al., 2017
<i>mcr-6</i>	F: GTCCGGTCAATCCCTATCTGT R: ATCACGGGATTGACATAGCTAC	556 bp	Wang X et al., 2018
<i>mcr-7</i>	F: TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT R: TTCATCTGCGCCACCTCGT	892 bp	Yang YQ et al., 2018
<i>mcr-7.1</i>	F: AGGGGATAAACCGACCCTGA R: TGATCTCGATGTTGGGCACC	355 bp	Yang YQ et al., 2018
<i>mcr-8</i>	F: AACCGCCAGAGCACAGAATT R: TTCCCCCAGCGATTCTCCAT	667 bp	Wang X et al., 2018
<i>mgrB</i>	F: TTAAGAAGGCCGTGCTATCC R: AAGGCGTTCATTCTACCACC	253 bp	Cannatelli A et al., 2014

#### 4.1.6. Protocolli di PFGE

Il DNA batterico è stato digerito con *XbaI* (Fermentas, Milano, Italia) per *K. pneumoniae* e separatamente con *ApaI* e *AscI* per i ceppi di *A. baumannii* seguendo il protocollo PulseNet, come riportato precedentemente (Durmaz et al., 2009; Han H et al., 2013), apportando alcune modifiche.

Sono state utilizzate specifiche condizioni:

- per *K. pneumoniae*:

initial switch time 5 secondi;

final switch time 40 secondi;

ore di corsa 24;

voltaggio 6 V/cm;

temperatura 14°C;

- per *A. baumannii*:

initial switch time 5 secondi;

final switch time 30 secondi;

ore di corsa 20;

voltaggio 6 V/cm;

temperatura 14°C.

I profili di restrizione sono stati analizzati tramite il software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio), confrontando i frammenti ottenuti con le bande del ladder di riferimento (Promega-Markers® Lambda Ladder) e il ceppo *Salmonella braenderup*. I dendrogrammi sono stati generati utilizzando il coefficiente di Dice e il metodo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) (Giani T et al., 2015). L'interpretazione delle bande ottenute è stata eseguita in accordo con i criteri di Tenover (Tenover FC et al., 1995; Sammarco ML et al., 2014),

impostando il *cut-off* di similarità pari a 85% e 90% per l'identificazione di cluster rispettivamente in *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, e del 95% per individuare i pulsotipi in entrambe le specie batteriche. È stato, inoltre, calcolato l'indice di diversità di Simpson (D) per valutare il potere discriminante della metodica di tipizzazione della PFGE eseguita con i diversi enzimi attraverso il seguente calcolo:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

dove  $N$  = numero totale di ceppi analizzati;  $S$  = numero totale di sottotipi (pulsotipi);  $n_j$  = numero totale di ceppi appartenenti al sottotipo (Hunter P et al., 1988).

#### 4.1.7. Protocolli di MLST

È stato utilizzato lo schema MLST di Pasteur per *K. pneumoniae* (Tabella 8) (Diancourt L et al., 2005) e lo schema di Oxford per *A. baumannii* (Tabella 9) (Bartual S et al., 2005). Entrambi gli schemi hanno previsto l'amplificazione di 7 geni *housekeeping*, i cui prodotti di PCR sono stati sequenziati con il metodo di Sanger (Eurofins Genomics srl). L'identificazione dei profili allelici e l'assegnazione del Sequence Type (ST) è stata effettuata mediante l'utilizzo della piattaforma Pasteur (<https://bigsd.bpasteur.fr/>). È stato, inoltre, calcolato l'indice di diversità di Simpson (D) per valutare il potere discriminante della metodica MLST.

**Tabella 8:** Schema MLST di Pasteur per *K. pneumoniae*

Locus	Gene	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare
<i>rpoB</i>	Subunità beta della RNA-Polimerasi	VIC3: GGCGAAATGGCWWGAGAACCA	501 bp
		VIC2: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi	gapA173: TGAAATATGACTCCACTCACGG	450 bp
		gapA181: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	Malato-deidrogenasi	mdh130: CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	477 bp
		mdh867: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	Fosfoglicosio isomerasi	pgi1F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432 bp
		pgi1R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	Fosfoporina E	phoE604.1: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420 bp
		phoE604.2: TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	Fattore II di iniziazione alla trascrizione	infB1F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318 bp
		infB1R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	Trasduttore periplasmatico di energia	tonB1F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414 bp
		tonB2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	

**Tabella 9:** Schema MLST di Oxford per *A. baumannii*

Locus	Gene	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare
<i>gltA</i>	Citrato sintasi	gltAF: AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	722 bp
		gltAR: GCAGAGATAACCAGCAGAGATACACG	
<i>gyrB</i>	DNA girasisubunità B	gyrB_F: TGAAGGCGGCTTATCTGAGT	594 bp
		gyrB_R: GCTGGGTCTTTTCCTGACA	
<i>gdhB</i>	Glucosio deidrogenasi B	GDHB1F: GCTACTTTTATGCAACAGAGCC	774 bp
		GDHB2F: ACCACATGCTTTGTTATG	
<i>recA</i>	Fattore di ricombinazione omologa	recAF: CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	425 bp
		recAR: GTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
<i>cpn60</i>	chaperonina 60-kDa	cpn60F: GGTGCTCAACTTGTTTCGTGA	640 bp
		cpn60R: CACCGAAACCAGGAGCTTTA	
<i>gpi</i>	Glucosio-6-fosfate isomerasi	gpi_F: GAAATTTCCGGAGCTCACAA	456 bp
		gpi_R: TCAGGAGCAATACCCCACTC	
<i>rpoD</i>	RNA polimerasi fattore sigma	rpoD-F: ACCCGTGAAGGTGAAATCAG	672 bp
		rpoD-R: TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT	

#### 4.2. *S. enterica* non tifoidea a trasmissione alimentare e antibiotico-resistenza

Nell'ambito dei controlli microbiologici ufficiali del Public Health England (PHE), nel periodo tra aprile 2013 e agosto 2018, sono stati raccolti 74.958 campioni di diversa origine, provenienti da alimenti, mangimi, acqua e campioni ambientali. I campioni sono stati prelevati presso Port Health Officers e Environmental Health Departments o Port Health Authorities in accordo con le linee guida sulle pratiche alimentari della Food Standards Agency (Food Standards Agency, 2015). Dopo la raccolta, i campioni sono stati conservati ad una temperatura  $<8^{\circ}\text{C}$  e sono stati testati entro 24 ore nei Laboratori di microbiologia del PHE, sezione Food Water & Environmental (FW&E).

Tali Laboratori sono dislocati su tutto il territorio inglese, precisamente nelle città di Londra-Colindale, York, Porton, Birmingham e Preston. I campioni sono stati testati per la presenza di *Salmonella* seguendo il metodo EN/ISO 6579 (International Organisation for Standardisation, 2002).

I dati di ogni campione sono stati raccolti attraverso la compilazione di moduli di richiesta o mediante trasferimento diretto dai sistemi informativi dell'Autorità locale o portuale ad un sistema di gestione delle informazioni di laboratorio (Laboratory Information Management System-Starlims, Abbot). Per ogni campione, sono state disponibili le seguenti informazioni: sito di prelievo e contesto (vendita al dettaglio, attività di catering, posto d'ispezione frontaliere ecc.), data di raccolta, Paese di origine, tipo di campione e, se pertinente, tipo di alimento. L'identificazione di *Salmonella* è stata eseguita in ogni laboratorio FW&E come indicato nel metodo EN/ISO 6579 (International Organization for Standardization, 2002) e, se è stato possibile l'isolamento, il ceppo è stato inviato al PHE-Gastrointestinal Bacterial Reference Unit (GBRU) per confermarne l'identificazione.

#### **4.2.1 Analisi di un database relativo a campioni di diversa origine per valutare la prevalenza di *Salmonella* spp.**

L'analisi dei dati ha riguardato 74.958 campioni di diversa origine, includendo alimenti, mangimi, acqua e campioni ambientali. Per ciascuno di essi, sono state disponibili le seguenti informazioni: numero del campione (ID), data di registrazione del campione, sito di prelievo, descrizione del campione, profilo descrittivo per tipo di campione e motivo del campionamento, Paese di provenienza, tipo di test effettuato, risultati dei test di laboratorio, positività e negatività per contaminazione da *Salmonella* spp, serovar e altre informazioni.

Il primo passo nell'analisi ha previsto la classificazione dei campioni in 4 macroaree: 'alimento', 'ambientale', 'acqua' e 'mangimi'. In particolare, la categoria 'alimento' (o 'prodotto alimentare') ha raggruppato qualsiasi sostanza o prodotto, sia esso trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato a essere e/o ragionevolmente previsto che venga ingerito dall'uomo. Il termine 'alimento' ha, quindi, incluso: bevande, gomme da masticare e qualsiasi sostanza, compresa l'acqua, incorporata intenzionalmente negli alimenti durante la loro fabbricazione, preparazione o trattamento in conformità al Regolamento (CE) n. 178/2002 art. 2.

È stata poi effettuata un'ulteriore classificazione in 'ready to eat' (pronto al consumo) (RTE) e in 'non-ready to eat' (non pronto al consumo, non-RTE). Gli 'alimenti pronti - RTE' sono destinati dal produttore al consumo umano diretto senza la necessità di cottura o altra lavorazione efficace a eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti, come riportato nel Regolamento (CE) 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici per i prodotti alimentari (art. 2). Questo tipo di alimento non richiede alcun processo prima del consumo. Per 'trasformazione', invece, si intende qualsiasi azione che altera sostanzialmente il prodotto iniziale o prodotto non trasformato, includendo i processi di riscaldamento, affumicatura, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali processi. Pertanto, i "prodotti trasformati" sono definiti come alimenti ottenuti dalla trasformazione di prodotti non trasformati e possono contenere

ingredienti necessari per la loro fabbricazione o per conferire loro caratteristiche specifiche (Regolamento CE n. 852/2004). La categoria RTE include anche prodotti non trasformati, come erbe e spezie, foglie e semi e tutte le verdure che possono essere consumate crude, come ortaggi e frutta.

Un alimento è stato considerato “non RTE” quando è previsto che il consumatore effettui delle manipolazioni per scopi appetibili, gastronomici o culinari. Gli alimenti grezzi possono essere 'prodotti non trasformati', ovvero alimenti che non sono stati sottoposti a trattamenti; essi comprendono prodotti che sono stati divisi, tagliati, disossati, tritati, scuoiati, macinati, puliti, rifilati, sbucciati, macinati, refrigerati, congelati, surgelati o scongelati (Regolamento CE n. 852/2004).

I campioni alimentari sono stati successivamente classificati in tre gruppi: prodotti di origine 'animale' o 'non animale' o come alimenti 'composti'.

La categoria degli alimenti 'composti' ha incluso prodotti alimentari destinati al consumo umano che contengono sia prodotti trasformati di origine animale, sia prodotti di origine vegetale e comprende quelli in cui la trasformazione del prodotto primario è parte integrante della produzione del prodotto finale '(Decisione 2007/275/CE). Esempi di alimenti composti sono stati sandwich con prosciutto e insalata, insalata mista con tonno e uova, lasagne, dessert composti da cereali e latticini e maionese fatta da uova e olio vegetale.

I campioni alimentari di origine animale sono stati ulteriormente suddivisi in diverse categorie:

- categoria 'pesce', che ha raggruppato diversi tipi di frutti di mare, di acqua dolce o di origine marina come molluschi, crostacei e pesci ossei;
- categoria “carne”, che ha incluso tutte le parti dei bovini domestici, carne suina, ovina, caprina e avicola adatte al consumo umano;
- categoria ‘prodotti caseari’, che ha compreso tutti i prodotti derivati esclusivamente dal latte, come formaggi, burro, gelati, latte e yogurt;
- categoria 'uova', ovvero uova in guscio, come quelle prodotte da galline, anatre, oche, tacchini, faraone o quaglie;
- categoria 'Altro' (ad esempio farina di insetti).

I campioni di alimenti di origine non animale per il consumo umano sono stati suddivisi in:

- categoria “Verdura”, includendo la frutta da sola o in combinazione con altra frutta, tutte le verdure da sole o in combinazione con altre verdure, crude o cotte; in essa sono state incluse anche frutta e verdura in scatola, refrigerata e congelata, frutta sciroppata e verdure in salamoia, funghi, semi e foglie;
- categoria “Altro tipo di cibo”, includendo una minoranza di alimenti diversi, come grasso di origine vegetale.

I campioni classificati come 'mangimi' hanno riguardato qualsiasi sostanza o prodotto, compresi gli additivi, trasformati, parzialmente trasformati o non trasformati, destinati ad essere utilizzati per l'alimentazione orale degli animali a norma del Regolamento (CE) n. 178/2002 (art. 2). Gli 'alimenti per animali domestici' sono materiali di origine vegetale o animale destinati al consumo da parte degli animali domestici, inclusi i prodotti denominati “*dog chews*” utilizzati per la pulizia dei denti degli stessi.

I campioni ‘ambientali’ sono stati suddivisi in:

- categoria “panno” usato per lavare e asciugare e trovato in un ambiente di produzione alimentare durante il monitoraggio microbiologico;
- categoria “tamponi” come campioni derivati da test di igiene nell'industria della ristorazione e alimentare o in un ristorante per verificare la contaminazione crociata e testare che le superfici e gli strumenti siano adeguatamente puliti;
- categoria “altro campione” meno numerosi o meno specifici.

Infine, i campioni di 'acqua' sono stati campionati da ambienti di produzione alimentare come lavello e taniche.



#### 4.2.2. Analisi dei campioni risultati positivi per *S. enterica* non tifoidea

Sono stati estrapolati i dati relativi a campioni contaminati da *Salmonella* non tifoidea (n=982), includendo anche le informazioni relative ai serovar e i dati di WGS. Il database ottenuto da STARLIMS è stato combinato con un altro ottenuto da MOLIS (software per la raccolta dei dati di laboratorio utilizzato da GBRU). I dati relativi ad un isolato sono stati automaticamente abbinati utilizzando un numero univoco di identificazione (ID). La corrispondenza è stata ottenuta anche manualmente laddove è stato necessario, utilizzando i documenti cartacei di ogni campione. Dopo aver effettuato una semplificazione del database, è stata effettuata un'analisi dei dati del numeratore mediante l'utilizzo di tabelle pivot Excel (Microsoft Office) focalizzando l'attenzione su provenienza, origine e serovar. Gli isolati di *Salmonella* provenienti dai laboratori di FW&E e ricevuti da GBRU nel 2013 sono stati tipizzati mediante sierotipizzazione convenzionale e categorizzati in serovar (Grimont PAD, Weill X, 2007), seguendo le linee guida WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* 'Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars' (Grimont PAD, Weill X, 2007). A partire dal 2014, la sierotipizzazione convenzionale è stata affiancata ad analisi di WGS, che è diventata la tecnica di elezione per tutti gli isolati (Ashton P et al., 2016). L'estrazione del DNA per l'analisi di WGS è stata effettuata presso i laboratori di GBRU del PHE, utilizzando un protocollo modificato di Qiasymphony DSP DNA midi kit (Qiagen, Hilden, Germania). La concentrazione del DNA estratto è stata determinata attraverso il sistema GloMax (Promega; Ashton P et al., 2015). Il sequenziamento del DNA è stato effettuato presso l'unità di Genome Sequencing and Development Unit del PHE usando un protocollo standard 2x101 basi con lo strumento HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) in modalità veloce. Utilizzando Trimmomatic (Ashton P et al., 2015), i frammenti delle letture del DNA sono stati tagliati e ritagliati e la qualità è stata ottenuta fino a raggiungere un punteggio PHRED inferiore a 30. Le sequenze inferiori a 50 bp sono state eliminate. Quindi, la sequenza definitiva ottenuta è stata confrontata con altre precedentemente archiviate, utilizzando la

pipeline KmerID del PHE (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>), al fine di identificare il serovar di *Salmonella* (Ashton P et al., 2015).

#### **4.2.3. Analisi dei determinanti di resistenza ottenuti mediante WGS in ceppi di *S. enterica* non tifoidea provenienti da tre aree geografiche**

Tra i campioni risultati positivi a *S. enterica* non tifoidea, è stata effettuata un'analisi relativa a 384 campioni, provenienti da Regno Unito (n=77), Thailandia (n=66) e Brasile (n=241). Tali campioni sono stati selezionati per Paese di origine, includendo quelli da cui il Regno Unito importa la maggior parte degli alimenti contaminati da *S. enterica*, per effettuare il confronto dei dati di AMR effettuato mediante l'utilizzo di tabelle pivot Excel (Microsoft Office). Per l'identificazione dei determinanti di antibiotico-resistenza nei ceppi è stato impiegato l'algoritmo "Genefinder" che, utilizzando Bowtie 2, ha mappato la lettura della sequenza ottenuta mediante WGS con sequenze di riferimento e ha permesso di generare un file con Samtools (Langmead, Salzberg, 2012). Il match delle sequenze è stato definito positivo dopo aver soddisfatto diversi criteri: copertura della sequenza del 100%; variazione base-call >85%; identità nucleotidica >90% (Neuert S et al., 2018). Il database di riferimento riguardante *Salmonella* non tifoidea contiene geni e mutazioni che codificano per resistenza a  $\beta$ -lattami, chinoloni, aminoglicosidi, sulfamidici, tetracicline, trimethoprim e fenicoli (Day M et al., 2018).

## 5. Risultati

### 5.1. *K. pneumoniae*

#### 5.1.1. Profili di antibiotico-resistenza

I risultati relativi alle concentrazioni minime di inibenti di antibiotico sono stati interpretati seguendo le linee guida EUCAST (Tabella 10).

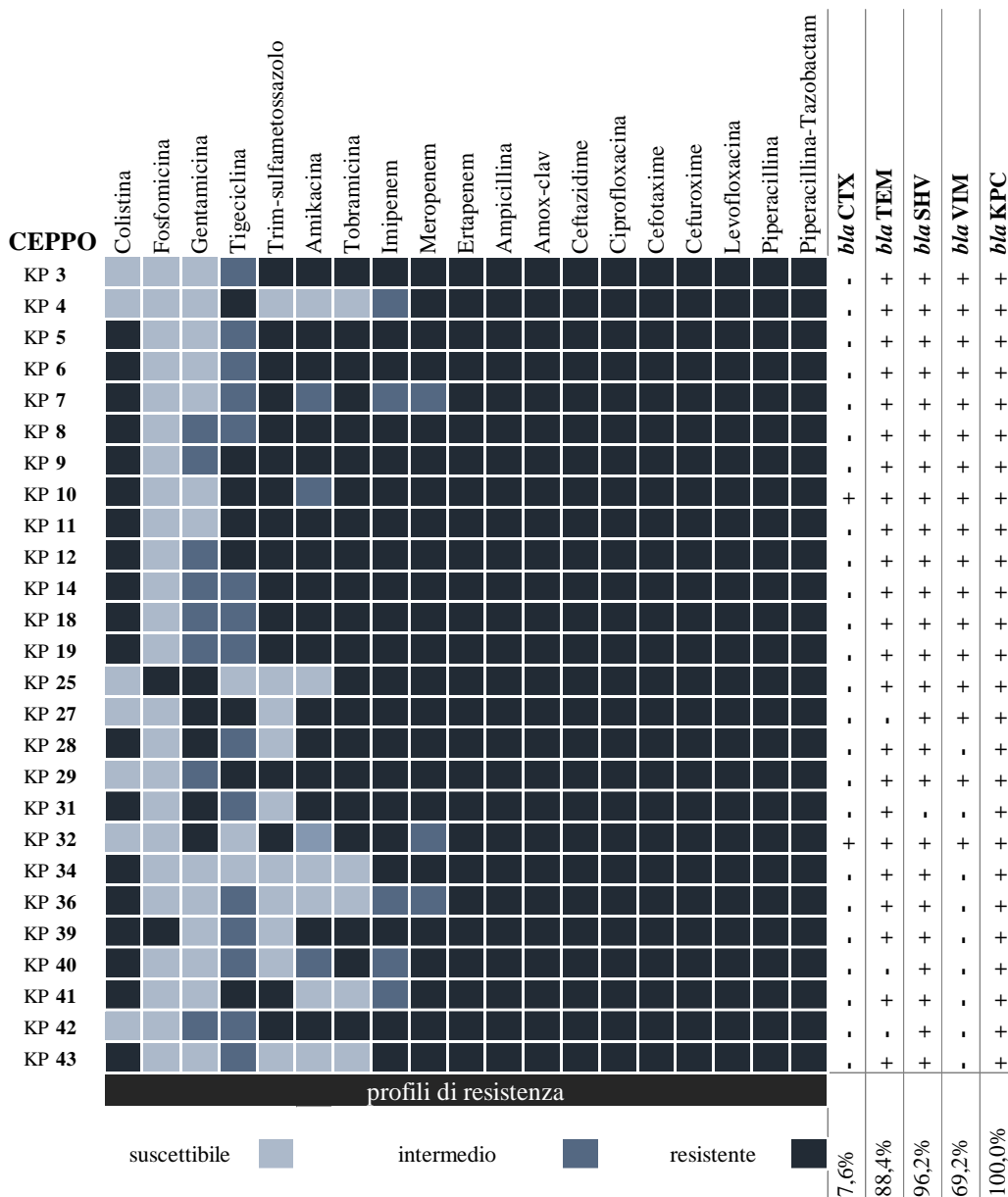
I 26 ceppi di *K. pneumoniae* hanno mostrato 21 diversi profili di resistenza (resistotipi) e caratteristiche di multiresistenza verso i carbapenemi: tutti i ceppi sono, infatti, risultati resistenti a ertapenem, 22 (84%) a meropenem e 20 (77%) a imipenem. Venti isolati sono stati caratterizzati come resistenti a tutti i carbapenemi testati. Inoltre, 19 (73%) ceppi sono risultati resistenti alla colistina (col-R). Nessun isolato ha mostrato suscettibilità verso ampicillina, amoxicillina-clavulanato, ceftazidime, ciprofloxacina, cefotaxime, cefuroxime, levofloxacina, piperacillina e piperacillina-tazobactam. Inoltre, l'81% (n=21) ha presentato resistenza verso tobramicina, 16 (62%) a trimetoprim, 16 (61,5%) nei confronti di amikacina, 8 (31%) a tigeciclina, 5 a gentamicina e 2 verso fosfomicina.

**Tabella 10:** Valori di *breakpoints* secondo EUCAST utilizzati per l'interpretazione dell'antibiogramma nei ceppi di *K. pneumoniae*

	MIC breakpoints (mg/L)	
	S ≤	R >
<b>Penicilline</b>		
Ampicillina	8	8
Amoxicillina-Clavulanato	8	8
Piperacillina	8	16
Piperacillina-Tazobactam	8	16
<b>Cefalosporine</b>		
Cefotaxime	1	2
Ceftazidime	1	4
Cefuroxime	8	8
<b>Carbapenemi</b>		
Ertapenem	0,5	0,5
Imipenem	2	4
Meropenem	2	8
<b>Fluoroquinoloni</b>		
Ciprofloxacina	0,25	0,5
Levofloxacina	0,5	1
<b>Aminoglicosidi</b>		
Amikacina	8	16
Gentamicina	2	4
Tobramicina	2	4
<b>Tetracicline</b>		
Tigeciclina	0,5	0,5
<b>Agenti misti</b>		
Cloramfenicolo	8	8
Colistina	2	2
Fosfomicina	32	32
Trimetoprim	2	4
Trimetoprim-sulfametossazolo	2	4

**5.1.2. Prevalenza dei geni di resistenza**

Il gene *bla*<sub>KPC</sub> è stato riscontrato in tutti i ceppi di *K. pneumoniae* e il 69,2% (n=18) è risultato positivo a *bla*<sub>VIM</sub>. Nella gran parte dei ceppi è stata, inoltre, osservata la presenza di ESBL. Infatti, i geni *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> sono stati amplificati rispettivamente nel 96,2% (n=25) e nell'88,4% (n=23) dei ceppi, mentre l'84,6% (n=22) li ha presentati entrambi. Il gene *bla*<sub>CTX-M</sub> è stato rilevato solo in due ceppi. Nessun isolato batterico ha mostrato la presenza di *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> o *bla*<sub>OXA-48</sub> (Figura 1).



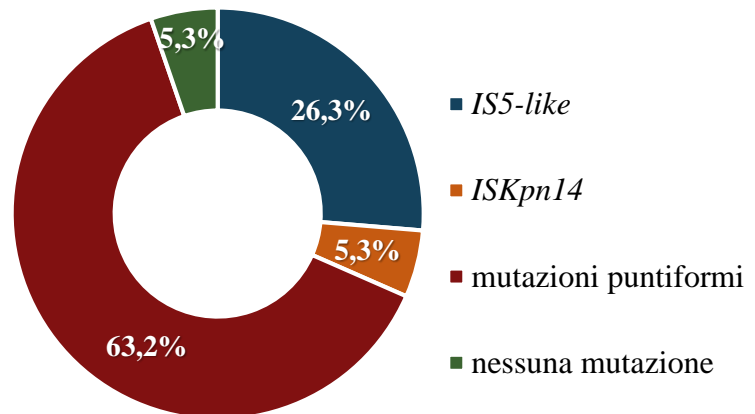
**Figura 1:** Resistotipo e genotipo di resistenza nei 26 ceppi di *K. pneumoniae*

### 5.1.3. Prevalenza delle varianti *mcr* coinvolte nella resistenza alla colistina e analisi del gene *mgrB*

Nessuno dei 19 ceppi col-R ha mostrato la presenza delle varianti plasmidiche *mcr*-1,2,3,4,5,6,7,8. La resistenza alla colistina è stata successivamente indagata mediante l'analisi del gene cromosomale *mgrB*. Una prima valutazione è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio, considerando il peso molecolare di riferimento di 253 bp (Cannatelli A et al., 2014). I prodotti di PCR sono stati, quindi, sequenziati sia per identificare eventuali sequenze di inserzione (*IS*) presenti nel gene, sia per valutare la presenza di mutazioni coinvolte nell'acquisizione di resistenza per disattivazione della proteina.

Ampliconi con un peso molecolare superiore a quello atteso sono stati osservati in 6 (31,6%) ceppi col-R e il sequenziamento ha confermato la presenza di un trasposone.

In particolare, il trasposone più frequentemente identificato è risultato appartenente alla famiglia *IS5*-like (1056 bp), presente in 5/19 (26%) ceppi. Il trasposone *ISKpn14* è stato identificato solo nel ceppo KP11 (Figura 2).



**Figura 2:** Tipi di mutazione identificate nel gene *mgrB* nei ceppi col-R di *K. pneumoniae*

Nei 12 ceppi col-R con un amplicone atteso di 253 bp (Figura 2) sono state identificate mutazioni puntiformi nel gene *mgrB*, previa analisi delle sequenze in confronto con un ceppo *wild-type* di riferimento (Cannatelli A et al., 2014) e a due ceppi con fenotipo di sensibilità verso la colistina. In dettaglio, i ceppi KP9 e KP10 (10,5%) hanno riportato la presenza di una delezione ( $\Delta$ g19) con conseguente mutazione *frameshift* nel gene e prematura terminazione della proteina MgrB.

Nel 42,1% (n=8; KP5, KP31, KP34, KP36, KP40, KP41 e KP43) dei ceppi era presente la mutazione missenso t95→g che dopo la traduzione è stata rappresentata dalla sostituzione V32G; la mutazione missenso c62→a tradotta come T21N è stata osservata in un solo ceppo (KP28), come la mutazione missenso g60→a tradotta in W20Stop presente in KP31. In un solo ceppo (KP6) non è stato possibile individuare mutazioni all'interno del gene. Le sequenze proteiche, previa identificazione del *reading frame*, sono state allineate con BioEdit, insieme con tre sequenze di riferimento per individuare le eventuali mutazioni presenti (Figure 3 e 4). Le sequenze ottenute, sia quelle *wild-type* di *mgrB* nei ceppi KP25 e KP42 (Accession numbers: MN389772 e MN389773, rispettivamente), sia quelle dei ceppi col-R che non hanno presentato *IS* (KP5, KP6, KP7, KP9, KP10, KP28, KP31, KP34, KP36, KP39, KP40, KP41 e KP43) sono state depositate sulla piattaforma BankIt/GenBank (Accession numbers: MN389775, MN389774, MN389776, MN389777, MN389778, MN389779, MN389780, MN389781, MN389782, MN389783, MN389784, MN389785 e MN389786, rispettivamente). Successivamente, le mutazioni individuate sono state analizzate con PROVEAN e i risultati sono riportati in Tabella 11.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                10         20         30         40         50
WT (Cannatelli 2014) GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP25                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP42                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP5                  GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP6                  GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP7                  GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP9                  GTGAAAAAAT TACGGTGG-T TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP10                 GTGAAAAAAT TACGGTGG-T TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP28                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP31                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP34                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP36                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP39                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP40                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP41                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
KP43                 GTGAAAAAAT TACGGTGGGT TTTACTGATA GTCATCATAG CAGGCTGCCT
      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
                60         70         80         90        100
WT (Cannatelli 2014) GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP25                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP42                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP5                  GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP6                  GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP7                  GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP9                  GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP10                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP28                 GTTGCTGTGG AATCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP31                 GTTGCTGTGA ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGTTTCAGT
KP34                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP36                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP39                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP40                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP41                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
KP43                 GTTGCTGTGG ACTCAGATGC TTAACGTAAT GTGCGACCAG GATGGTTCAGT
      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ...|
                110        120        130        140        144
WT (Cannatelli 2014) TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP25                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP42                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP5                  TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP6                  TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP7                  TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP9                  TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP10                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP28                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP31                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP34                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP36                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP39                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP40                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP41                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA
KP43                 TTTTCAGCGG CATTGCACT ATTAATAAAT TTATTCCGTG GTAA

```

**Figura 3:** Allineamento delle sequenze di *mgrB* nei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alla colistina in confronto con le sequenze di ceppi *wild-type*

*Note:* le sequenze di ceppi *wild-type* (WT) sono evidenziate in blu, mentre le mutazioni individuate in rosso.



	WT (Cammatelli 2014)	KP25 (WT)	KP42 (WT)	KP6	KP5	KP7	KP34	KP36	KP39	KP40	KP41	KP43	KP28	KP31	KP9	KP10
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
4	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
7	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	F	F
8	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	Y	Y
9	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	stop	stop
10	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
11	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
13	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
15	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
16	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
17	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		
18	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		
19	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		
20	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	stop	
21	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	N		
22	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
23	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		
24	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		
25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
26	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
27	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		
28	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
29	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		
30	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
31	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		
32	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	G	V		
33	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
34	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		
35	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		
36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
37	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
38	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
39	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
40	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
41	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
42	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
43	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		
44	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		
45	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
46	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
47	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		
48	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop	stop		

**Figura 4:** Allineamento delle sequenze proteiche ottenute per MgrB nei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alla colistina in confronto con ceppi *wild-type*

*Note:* le sequenze proteiche di MgrB nei ceppi *wild-type* (WT) sono evidenziate in grigio scuro, mentre le mutazioni in rosso.

**Tabella 11:** Risultati dell'analisi effettuata con PROVEAN di ogni sostituzione amminoacidica di MgrB nei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alla colistina

<b>Ceppo</b>	<b>Variazione amminoacidica</b>	<b>Descrizione</b>	<b>PROVEAN score</b>	<b>Risultato (cut off= -2.5)</b>
KP5 KP7 KP31 KP34 KP36 KP40 KP41 KP43	V32G	Valina in posizione 32 è mutata in Glicina	-7	Mutazione deleteria
KP28	T21N	Treonina in posizione 21 è mutata in Asparagina	-3.23	Mutazione deleteria

*Note:* Le varianti e la loro descrizione sono riportate rispettivamente nella seconda e terza colonna. Lo score PROVEAN è una misura del cambiamento nella struttura delle proteine: se il punteggio è uguale o inferiore alla soglia predefinita (cut-off = -2,5), si prevede che la variante abbia un effetto 'deleterio'; se superiore, si prevede che la variante abbia un effetto 'neutro'. Nell'ultima colonna è descritto l'effetto della mutazione sulla funzionalità della proteina.

#### 5.1.4. Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLST

La PFGE effettuata per i 26 ceppi di *K. pneumoniae* ha mostrato la presenza di 12 clusters all'85% di similarità. Il cluster VIII è stato il più frequente, raggruppando 9 (34,6%) isolati, tra cui i ceppi contenenti IS5-like (KP8, KP12, KP14, KP18 e KP19), seguito dal cluster V con tre isolati; invece, ai clusters III, IV e VI è stato associato un solo isolato. L'analisi del dendrogramma ad un livello di similarità del 95% ha mostrato la presenza di 18 pulsotipi (PT) e il PT12 è risultato prevalente (n=4, 15,3%), seguito da PT1, PT3, PT8 e PT10, ciascuno associato a due ceppi. Il potere discriminante della PFGE è stato misurato mediante l'Indice di Diversità di Simpson (Hunter P et al., 1988), risultando pari al 96% (Figura 5).

L'analisi mediante MLST ha mostrato la circolazione di tre ST. Il ST512 è risultato prevalente (n=13, 50%), seguito da ST101 (n=10; 38,4%) e da ST307 (n=2; 7,6%). Per il ceppo KP10 non è stato possibile assegnare un ST poiché la combinazione allelica ottenuta (4-1-1-52-1-1-7) non è ancora presente nel database. È utile sottolineare che ST512 è stato prevalente nel periodo 2014-2015 (84,6%), mentre ST101 è stato predominante nella finestra temporale 2016-2017 (61,5%) (Figura 5). La metodica MLST ha mostrato un potere discriminante pari al 61%.

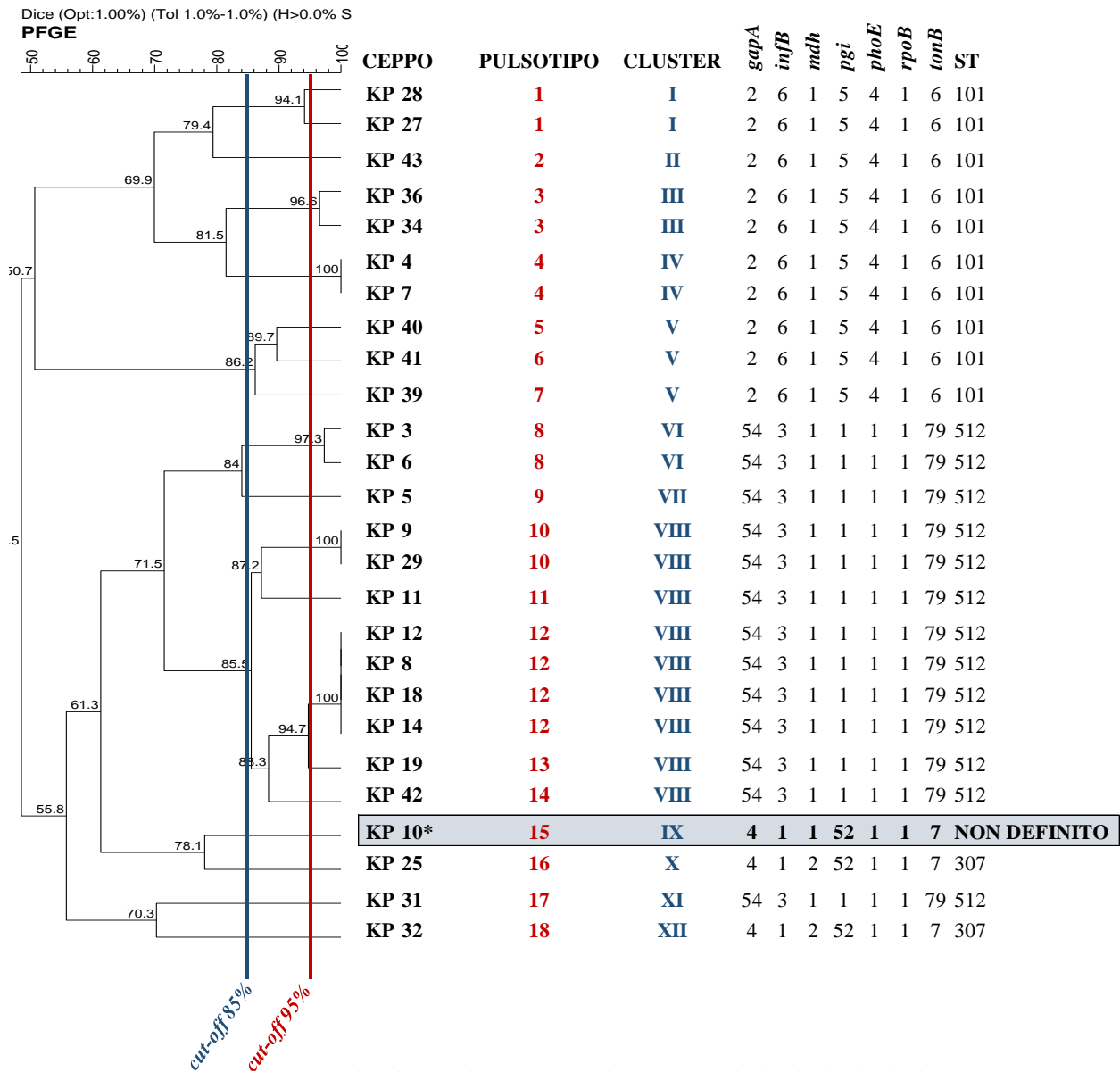


Figura 5: Tipizzazione molecolare dei ceppi di *K. pneumoniae* mediante PFGE e MLST

## 5.2. *A. baumannii*

### 5.2.1. Profili di antibiotico-resistenza

Tutti i risultati relativi alle concentrazioni minime di inibenti di antibiotico sono stati interpretati seguendo le linee guida EUCAST (Tabella 12).

Tutte i ceppi di *A. baumannii* (n=24) hanno presentato resistenza a ampicillina, amoxicillina-clavulonato, aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, cefazolina, cefoxitina, ciprofloxacina, cloramfenicolo, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacillina, piperacillina-tazobactam e tetraciclina. Per quanto concerne la classe degli aminoglicosidi, il 79,2% (n=19) e il 95,8% (n=23) dei ceppi è risultato resistente rispettivamente a gentamicina e amikacina. La resistenza a cefepime è stata riscontrata nel 91,3% (n=21). La quasi totalità (n=22, 95,7%) ha, invece, mostrato suscettibilità verso la colistina, fatta eccezione per AC3 risultato resistente. Tutti gli isolati sono risultati resistenti a trimetoprim, tranne il ceppo AC39.

**Tabella 12:** Valori di *breakpoints* secondo EUCAST utilizzati per l'interpretazione dell'antibiogramma in *A. baumannii*

	<b>MIC breakpoints (mg/L)</b>	
	<b>S ≤</b>	<b>R &gt;</b>
<b>Penicilline</b>		
Ampicillina	-	-
Amoxicillina-Clavulanato	-	-
Piperacillina	IE	IE
Piperacillina-Tazobactam	IE	IE
<b>Cefalosporine</b>		
Cefotaxime	-	-
Ceftazidime	-	-
Cefepime	-	-
Cefazolina	-	-
Cefoxitina	-	-
<b>Carbapenemi</b>		
Imipenem	2	4
Meropenem	2	8
<b>Monobattami</b>		
Aztreonam	-	-
<b>Fluorochinoloni</b>		
Ciprofloxacina	0,06	1
Levofloxacina	0,5	1
<b>Aminoglicosidi</b>		
Amikacina	8	16
Gentamicina	4	4
<b>Tetracicline</b>		
Tetraciclina	-	-
<b>Agenti misti</b>		
Cloramfenicolo	-	-
Colistina	2	2
Fosfomicina	-	-
Trimetoprim	-	-
Trimetoprim-Sulfametossazolo	2	4

*Legenda:*

IE: prove insufficienti che l'antibiotico sia un buon bersaglio per la terapia contro l'agente

- : non esistono *breakpoint*; il test di suscettibilità non è raccomandato.

### 5.2.2. Prevalenza dei geni di resistenza

In tutti i 24 ceppi di *A. baumannii* è stata riscontrata la presenza di *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub>. Al contrario, i geni *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub> non sono stati identificati. Inoltre, il gene *bla*<sub>VIM</sub> è risultato presente nel 33,3% (n=7) degli isolati. In particolare, sono risultati *bla*<sub>VIM</sub> positivi i ceppi AC3, AC14, AC15, AC16, AC19, AC20, AC22 ed AC39.

Per quanto concerne i geni codificanti per le pompe di efflusso, tutti i ceppi hanno mostrato la presenza di *adeB*, *adeJ*, *adeG*, *soxR* e *abeS*, mentre i geni *abeM* e *craA* sono risultati sempre assenti.

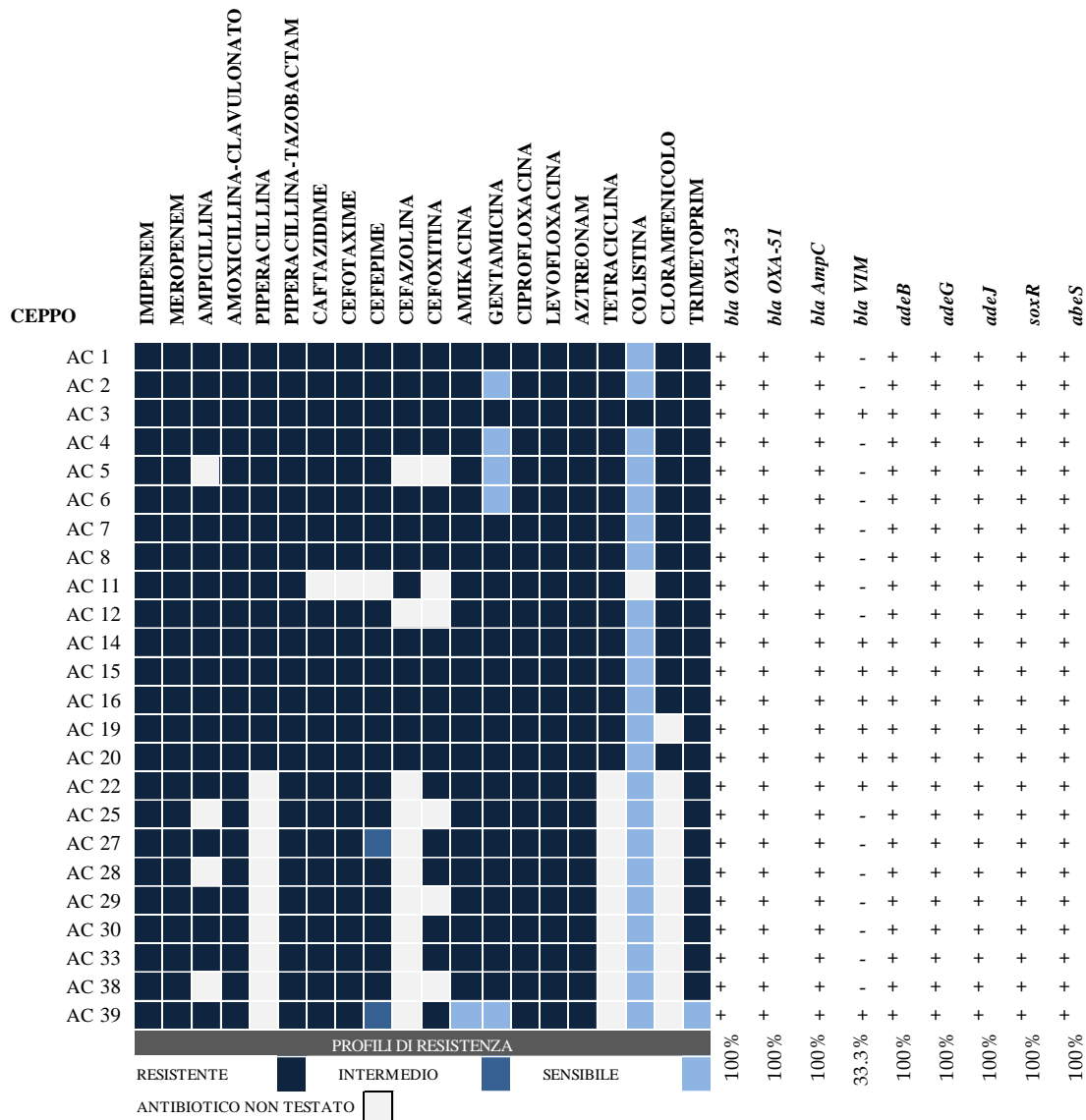


Figura 6: Resistotipo e genotipo di resistenza nei 24 ceppi di *A. baumannii*

### 5.2.3. Caratterizzazione molecolare mediante PFGE e MLST

I 24 ceppi di *A. baumannii* sono stati tipizzati mediante PFGE utilizzando separatamente gli enzimi di restrizione *ApaI* e *AscI*, al fine di identificare le eventuali relazioni clonali utili a stabilire potenziali correlazioni epidemiologiche.

Impostando il *cut-off* di similarità al 90%, mediante la combinazione dei profili ottenuti con entrambi gli enzimi, i 24 ceppi di *A. baumannii* sono stati raggruppati in quattro cluster (I-IV), analogamente a quanto ottenuto attraverso il solo enzima *ApaI* (Figura 7).

Il cluster I, è stato il raggruppamento più grande, includendo 10 (41,7%) ceppi, seguito dal cluster III con otto isolati (33,3%) e dal cluster IV con cinque (20,8%) isolati. Il cluster I ha raggruppato solo un ceppo, isolato nel reparto di nefrologia. I ceppi AC11, AC12, AC7 e AC8 hanno mostrato profili identici tra di loro, così come AC14, AC16, AC19, AC20 e AC22. L'analisi del dendrogramma generato con *ApaI*, ad un livello di similarità del 95% ha evidenziato 7 pulsotipi (PT), di cui il più frequente è stato PT4 associato ai 6 ceppi del cluster III; PT1, PT2 e PT7 sono stati associati a cinque ceppi. In particolare, PT1 è risultato associato ai primi cinque ceppi del cluster I; PT2 ai successivi cinque dello stesso cluster e PT7 agli isolati del cluster V. Solo i pulsotipi PT3, PT5 e PT6 sono stati associati ad un solo ceppo: PT3 ad un ceppo del cluster II, mentre PT5 e PT6 sono stati associati ciascuno ad un ceppo del cluster III (Figura 7). Inoltre, quattro ceppi (AC11, AC12, AC7 e AC8) con PT1 tutti hanno presentato i geni *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>AmpC</sub>*, *adeB*, *adeJ*, *adeG* e *abeS*.



PFGE *Apa I – Apa I/Asc I*

Dice (Opt:1.00%)(Tol 1.00%-1.00%)(H>0.0%)[0.0%-100.0%]

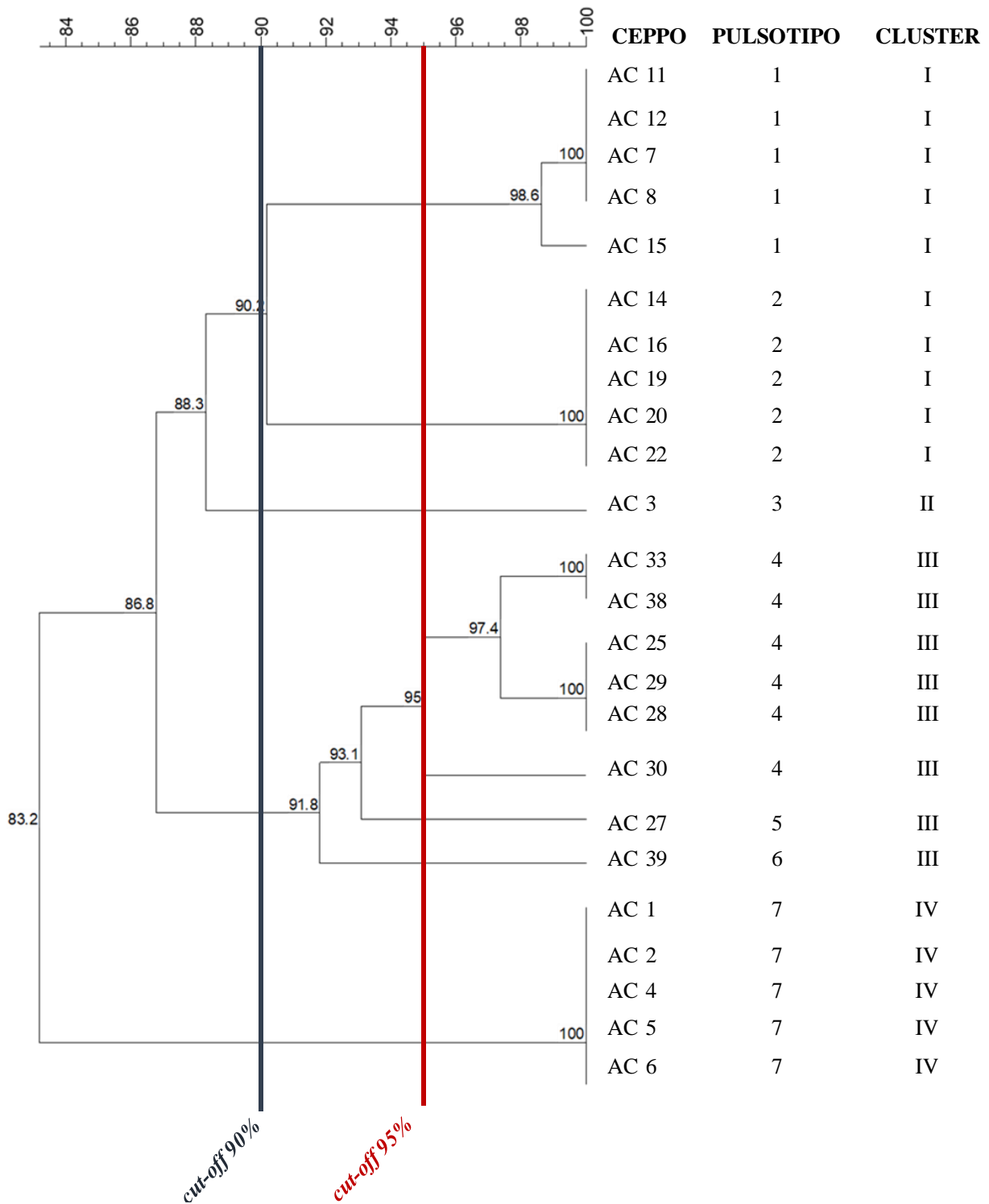
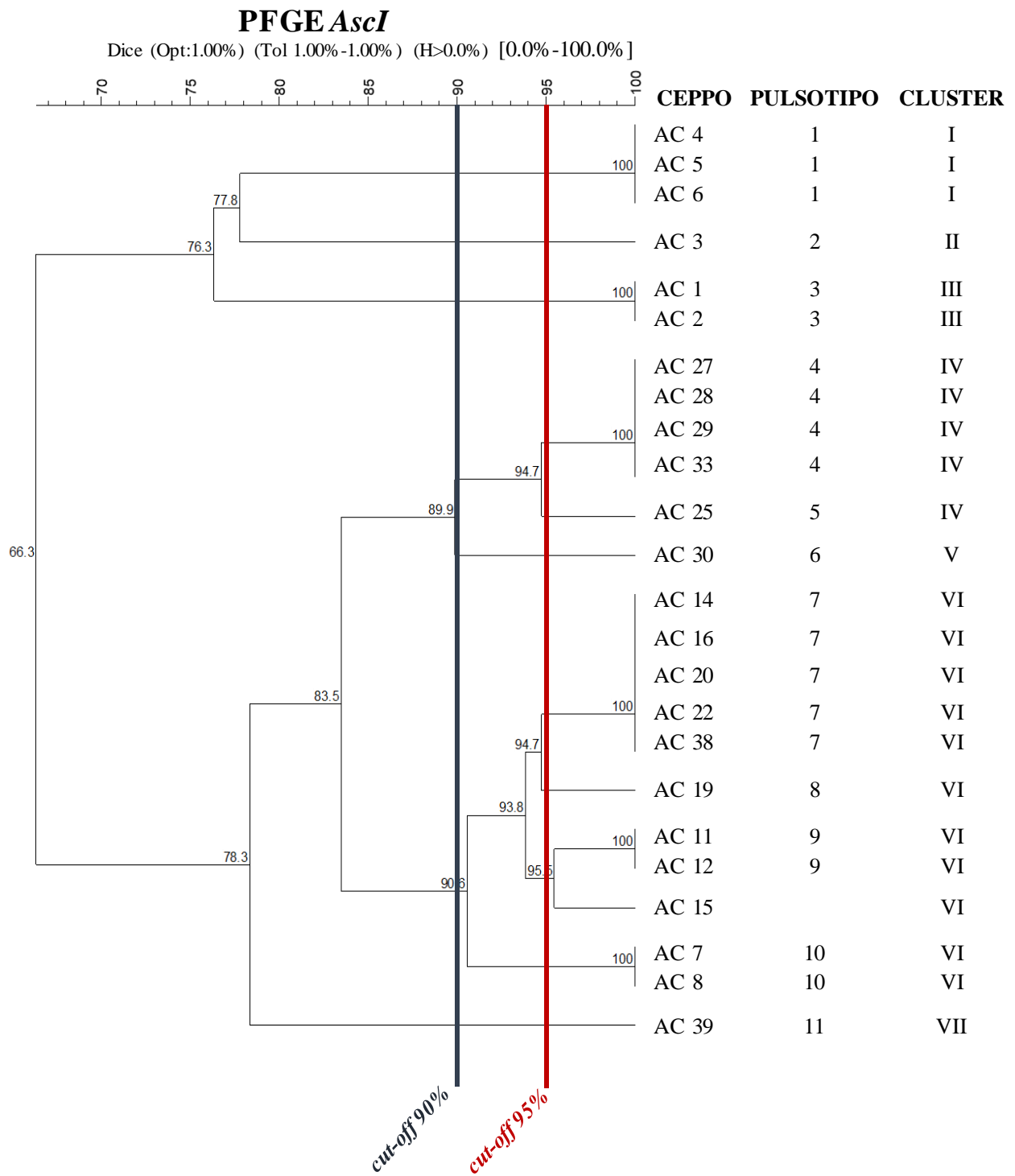


Figura 7: Dendrogramma ottenuto mediante PFGE con *ApaI* nei ceppi di *A. baumannii*

L'analisi del dendrogramma ottenuto mediante la digestione con l'endonucleasi *AscI*, al *cut-off* di similarità del 90%, ha rivelato sette cluster (I-VII) (Figura 8). Il cluster VI è stato prevalente raggruppando ben undici ceppi (45,8%) isolati tra luglio e novembre 2010, seguito dal cluster IV che ha incluso cinque ceppi (20,8%) isolati tra ottobre e novembre 2010. Nel cluster I sono stati raggruppati tre ceppi (12,5%) isolati nel mese di giugno 2010, AC4, AC5 ed AC6, identici tra loro. Nel cluster III, invece, sono stati inclusi i ceppi AC1 e AC2 (8,3%) identici tra loro, isolati ad aprile e maggio 2010. Il cluster II, V e VII hanno incluso solo un isolato, rispettivamente AC3 proveniente dal reparto di nefrologia, AC30 e AC39.

In questo caso, l'analisi del dendrogramma con *AscI* ad un livello di similarità del 95% ha evidenziato 11 pulsotipi, dei quali PT7 è stato il più frequente associato a cinque ceppi. Tale pulsotipo è stato seguito da PT4 associato a quattro ceppi e da PT1 e PT9, ciascuno associato a tre ceppi. Gli altri pulsotipi (PT2, 5, 6, 8 e 11), ad eccezione di PT3 e PT10 corrispondenti a due ceppi, sono stati associati ad un singolo ceppo. L'Indice di Simpson calcolato per la PFGE è risultato pari all'84% e al 91% rispettivamente per *ApaI* e *AscI*, sottolineando un elevato potere discriminante.

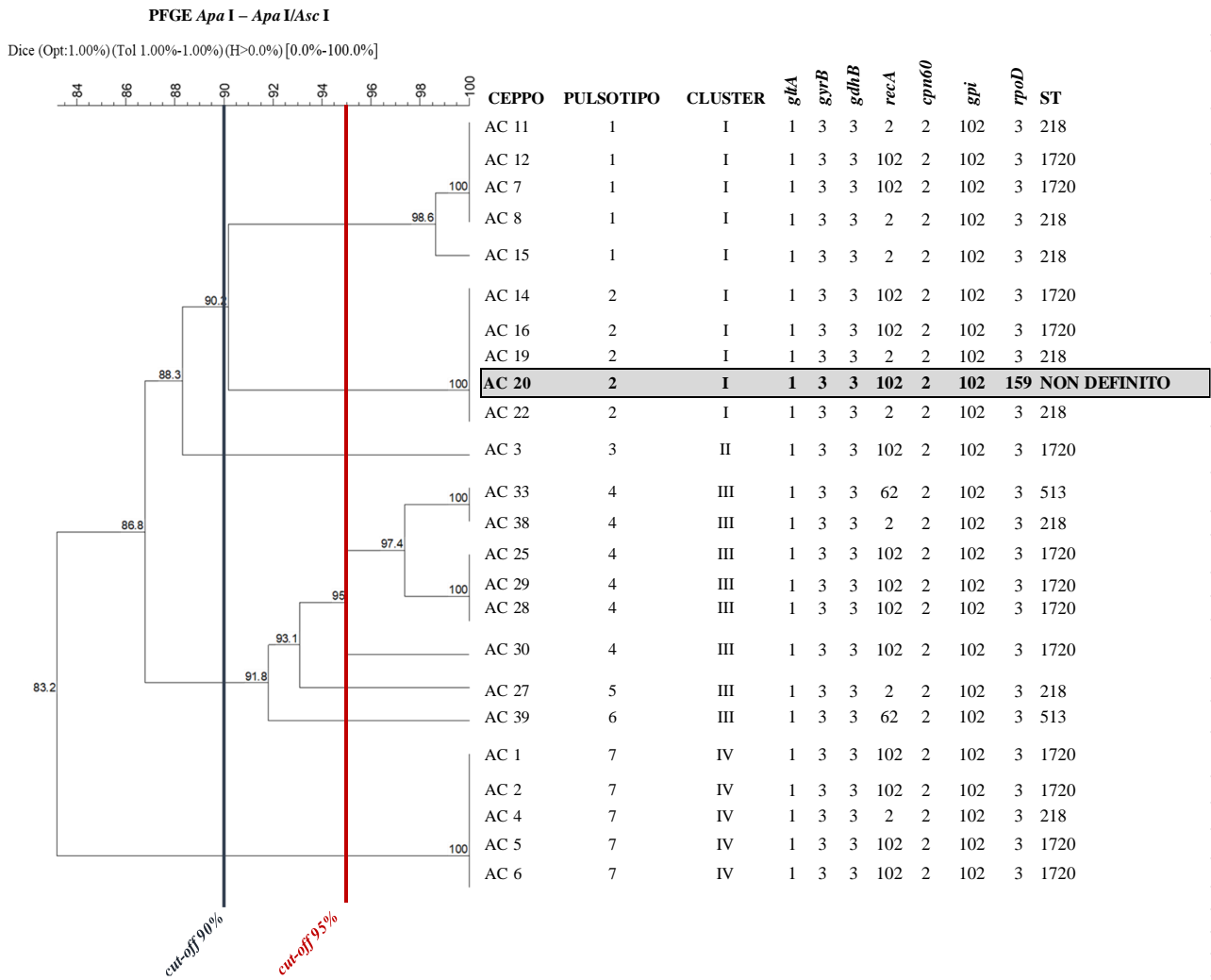


**Figura 8:** Dendrogramma ottenuto mediante PFGE con *AscI* nei ceppi di *A.baumannii*

L'analisi dei 24 ceppi di *A. baumannii* mediante MLST ha permesso di evidenziare tre ST. Di questi, ST1720 è stato prevalente (n=13; 54,2%), seguito da ST218 (n=8; 33,3%) e da ST513 (n=2; 8,3%). Per un ceppo, AB20, non è stato possibile assegnare un ST a causa di una combinazione allelica non riportata nel database e, quindi, ancora non depositata. I tre ST identificati sono risultati altamente correlati tra loro rappresentando ciascuno la variante monoallelica dell'altro. In dettaglio, utilizzando come riferimento ST1720, che è risultato prevalente, sono state osservate varianti monoalleliche per il gene *recA* sia per ST218 che per ST513, invece, nel caso del ST non definito, la variante monoallelica è stata riscontrata per il gene *rpoD* (Tabella 13). Il potere discriminante della metodica MLST è risultato pari al 61,2% (Figura 9).

**Tabella 13:** Varianti alleliche e ST nei ceppi di *A. baumannii* secondo lo schema MLST-Oxford

Geni e varianti alleliche								N (Prevalenza)
<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>	ST	
1	3	3	<b>102</b>	2	102	<b>3</b>	1720	13 (54,2%)
1	3	3	<b>2</b>	2	102	3	218	8 (33,3%)
1	3	3	<b>62</b>	2	102	3	513	2 (8,3%)
1	3	3	102	2	102	<b>159</b>	<b>non definito</b>	1 (4,2%)



**Figura 9:** Tipizzazione molecolare dei 24 ceppi di *A. baumannii* mediante PFGE (dendrogramma combinato *ApaI-AscI*) e MLST secondo lo schema Oxford

### 5.3. *S. enterica* non tifoidea

#### 5.3.1. Analisi di campioni di diversa origine

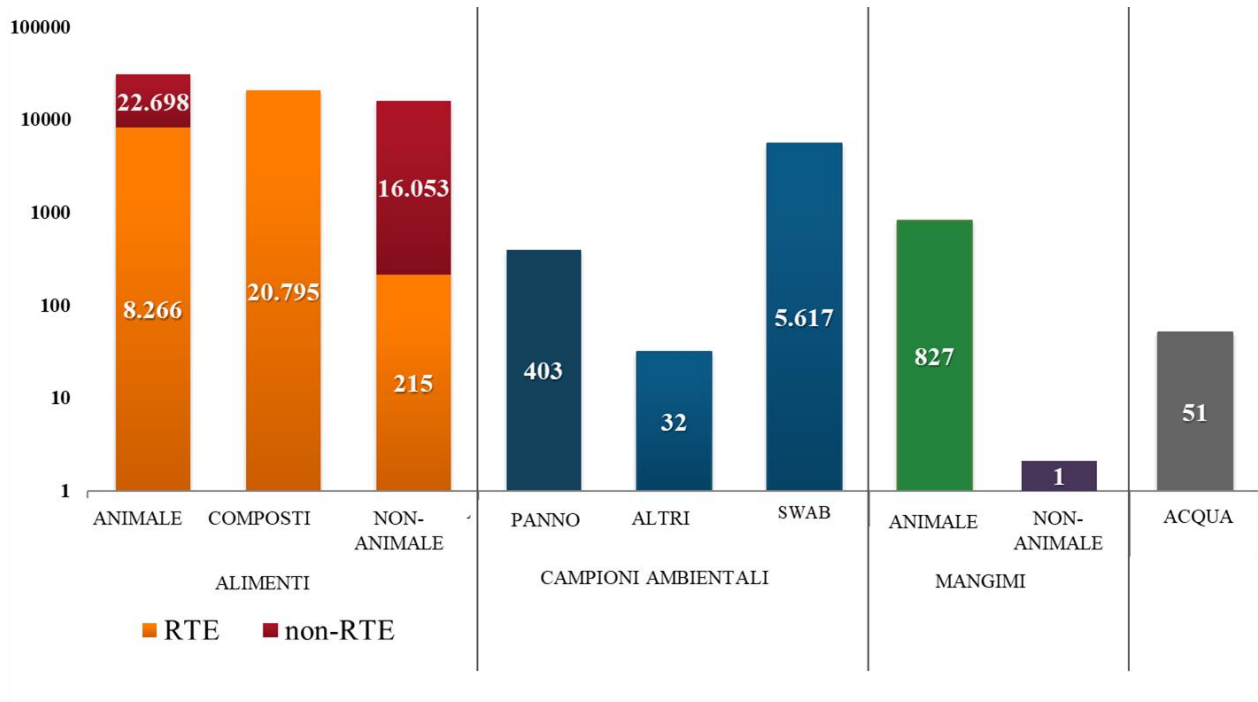
Un totale di 74.958 campioni sono stati sottoposti a test microbiologici per valutare la presenza di *Salmonella* spp. La maggior parte (n=30.537; 44,8%) è stata analizzata presso la sede dei Laboratori del FW&E di Colindale, Londra, mentre altri sono stati esaminati nei Laboratori di York (n=18.470; 24,6%), Porton (n=13.183; 17,6%), Birmingham (n=8.873; 11,8%) e Preston (n=3.936; 5,2%).

Il 90,7% (n=68.027) dei campioni era rappresentato da prodotti alimentari, l'8,1% (n=6.052) da fonti ambientali, l'1,1% (n=828) da mangimi e solo una minima parte (n=51; 0,07%) da acqua.

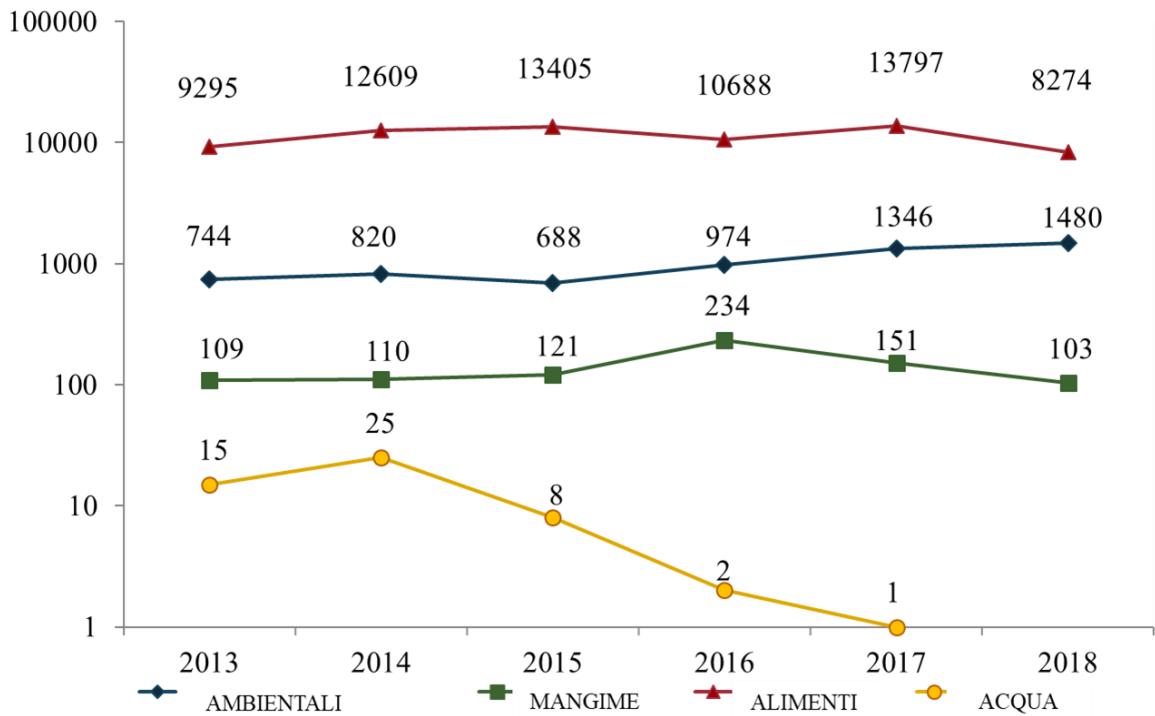
L'analisi dei campioni da matrici alimentari ha rivelato che la maggior parte era di origine animale (n=30.964; 45,5%), seguito da origine non-animale o vegetale (n=16.268; 23,9%) e prodotti composti (n=20.795; 30,6%). I campioni di mangime erano prevalentemente di origine animale (n=827/828; 99,9%). I campioni ambientali sono stati suddivisi in tre categorie: *swab* o tamponi (n=5.617; 92,8%), "panni" (n=403; 6,7%) e campioni di altra origine (n=32; 0,5%).

Successivamente, alimenti di origine animale sono stati suddivisi in alimenti "*ready to eat*" (RTE) (n= 22.698; 73,3%) e non-RTE (n=8.265; 26,7%). Gli alimenti di origine vegetale sono stati perlopiù di tipo RTE (n=16.053; 98,7%). La totalità dei prodotti alimentari composti (n=20.795) è stata classificata come RTE (Figura 10). Durante il periodo considerato, pari a cinque anni (2013-2018), la raccolta delle varie tipologie di campione è rimasta costante, fatta eccezione per i campioni di acqua che non sono stati mai prelevati nel 2018 (Figura 11).

**Figura 10:** Classificazione dei 74.958 campioni raccolti nell'ambito dei controlli igienico-sanitari nel Regno Unito nel periodo 2013-2018



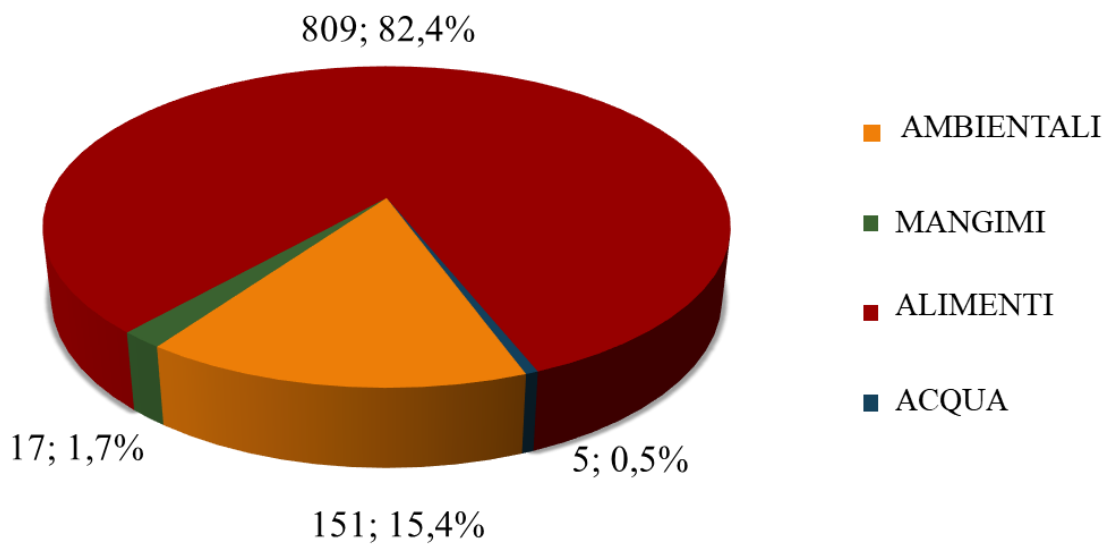
**Figura 11:** Raccolta delle varie tipologie di campione durante il periodo 2013-2018



### 5.3.2. Analisi dei campioni positivi per *S. enterica* non tifoidea

Il numero di campioni positivi per *Salmonella* non tifoidea è stato di n=982, pari all'1,3 % del totale.

L'82% (n=809) era rappresentato da campioni di cibo, il 15,4% (n=151) da quelli ambientali, l'1,7% (n=17) da mangime e 5 da acqua (Figura 12).



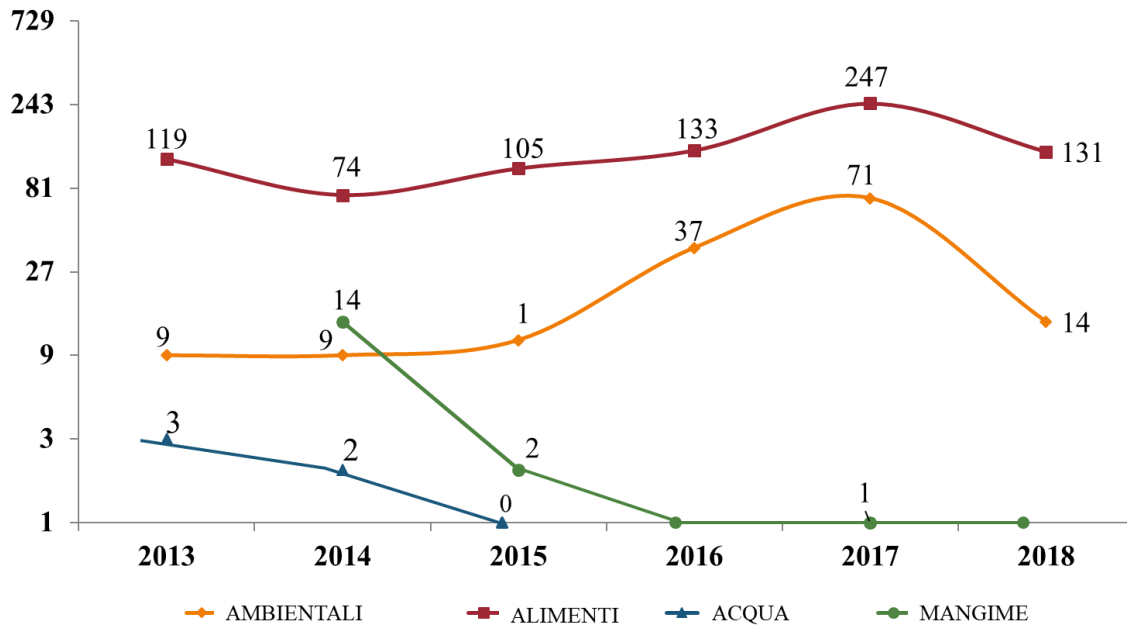
**Figura 12:** Descrizione dei 982 campioni risultati positivi per *S. enterica* non tifoidea classificati per tipologia di matrice

Il numero di ceppi di *S. enterica* non tifoidea isolati è risultato variabile nell'arco temporale agosto 2013-agosto 2018, registrando un picco nel 2017 (Figura13).

Sono stati registrati in media 162 campioni di cibo positivi per *Salmonella* per anno, l'1,2% dei campioni di origine alimentare analizzati, seguiti da campioni ambientali con una media di 30 per anno, ovvero il 2,5% dei campioni ambientali totali. Per quanto riguarda i campioni di alimenti per

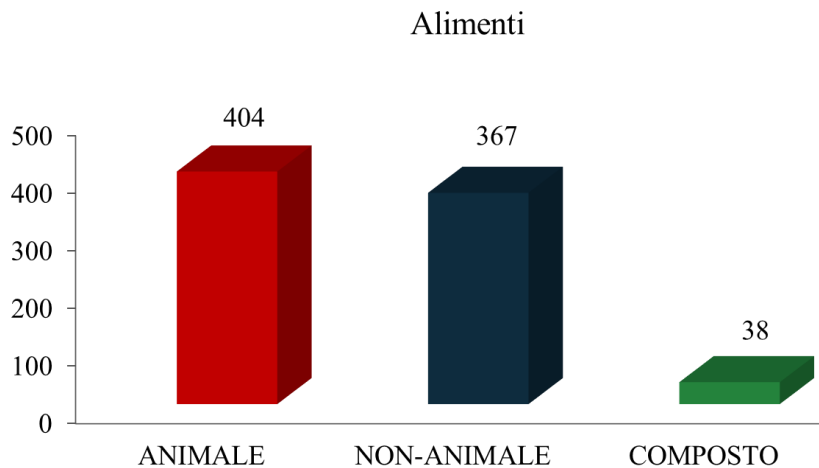


animali, sono stati in media 3 per anno, il 2% del totale. Infine, è stato individuato un campione di acqua per anno, rappresentando il 9,8% dei campioni totali di acqua.

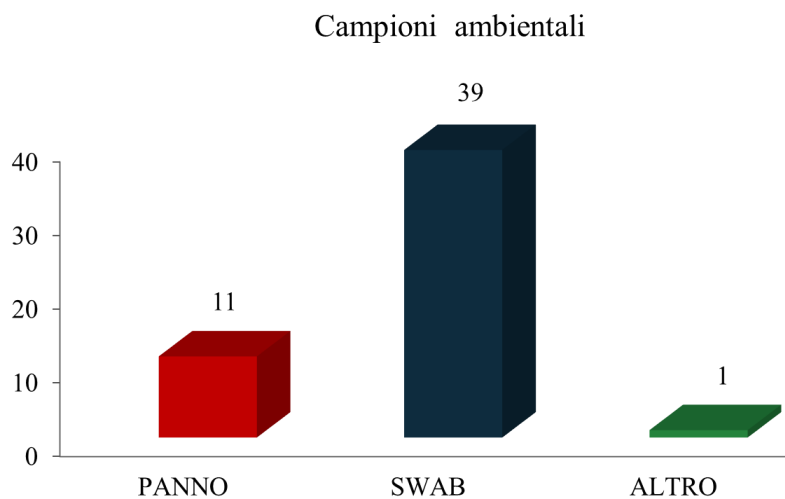


**Figura 13:** Isolamento di ceppi di *S. enterica* non tifoidea nel periodo agosto 2013-agosto 2018

Tra i campioni da alimenti risultati positivi per *S. enterica* non tifoidea, il 49,9% (n=404) è stato di origine animale, il 45,4% (n=367) di origine non animale e il 4,7% (n=38) è stato rappresentato da prodotti composti (Figura 14). La maggior parte dei campioni ambientali è stata rappresentata da swab (n=139), seguiti da panni (n=11; 7,28%) e filtri (n=1; 0,7%) (Figura 15).



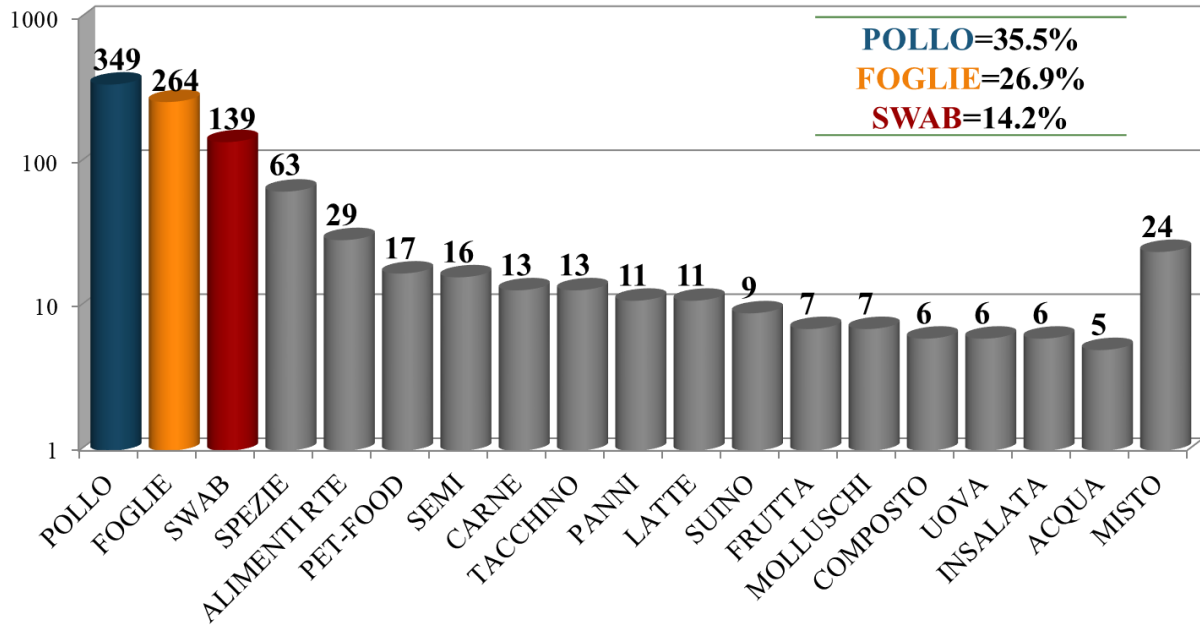
**Figura 14:** Descrizione dei campioni di origine alimentare positivi per *S. enterica* non tifoidea



**Figura 15:** Classificazione dei campioni di origine ambientale positivi per *S. enterica* non tifoidea

Tra i campioni di origine animale, l'88,1% (n=356) è stata classificata nella categoria non-RTE rappresentati soprattutto da carne (n=346; 97%), seguita da pesce (n=6; 1,6%) e uova (n=4; 1,1%). I campioni di origine animale classificati come RTE sono stati, invece, l'11,6% (n=47), soprattutto latticini (n=13; 27,7%) e carne (n=30; 63,8%). I campioni di origine non animale classificati come RTE sono stati solo ortaggi e frutta (n=367; 37,4%), mentre i cibi composti hanno rappresentato solo il 3,9% (n=38) dei campioni positivi. *S. enterica* non tifoidea è stata isolata soprattutto da campioni

di pollame (n=349; 35,5%), seguito da campioni di foglie masticabili (n=264; 26,9%), *swab* (n=139;14,2%) e spezie (n=63; 6,4%) (Figura 16).



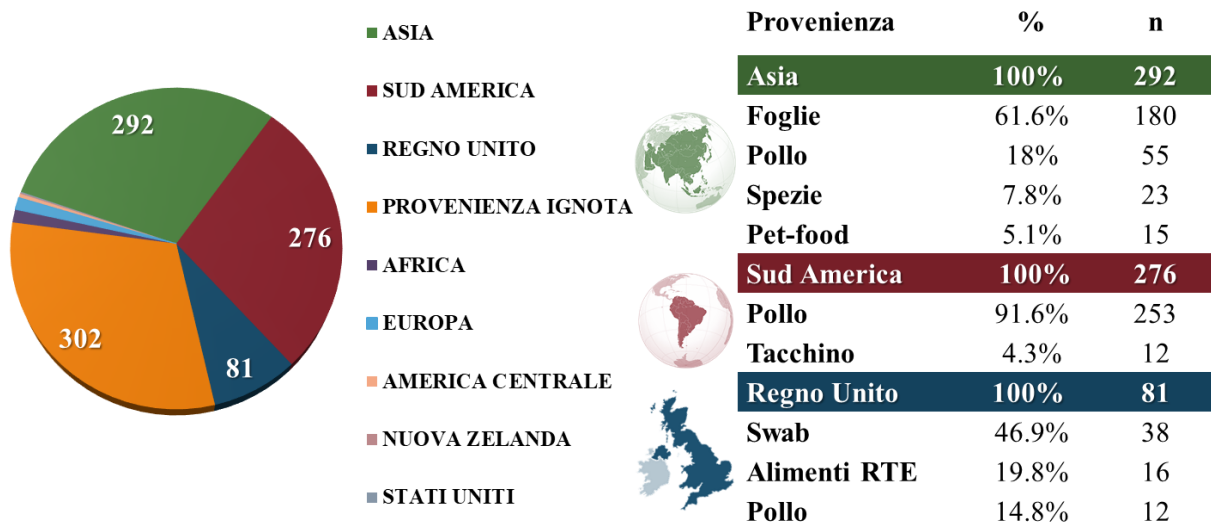
**Figura 16:** Campioni positivi all'isolamento di *S. enterica* non tifoidea per tipologia di matrice

In generale, la maggior parte (n=888/982; 90,4%) dei campioni positivi è stata importata da Paesi al di fuori della Comunità Europea, soprattutto Asia (n=292; 29,7%) e Sud America (n=276; 28,1%). I campioni ambientali positivi erano tutti provenienti dal Regno Unito (n=81; 8,2%) e perlopiù da *swab* (n=38, 46,9%). È da segnalare che per almeno un terzo dei campioni la provenienza è risultata non nota (Figura 17).

Il 61,6% (n=180) dei campioni positivi provenienti dall'Asia era rappresentato da foglie masticabili (*leaves*), seguito da campioni di pollame (n=55; 18,8%) e spezie (n=23; 7,9%) (Figura 17). Il 91,6% (n=253) dei campioni provenienti da Sud America era costituito da pollo, seguito da tacchino (n=12; 4,3%) (Figura 17).

Per quanto riguarda i campioni positivi provenienti dal Regno Unito, il 46,9% (n=38/81) è stato rappresentato da *swab*, mentre la restante parte è stata rappresentata da campioni di cibo, in particolare

da prodotti RTE contenenti pollo (n=16/81; 19,8%) come *sandwich* di pollo, seguito da pollo RTE (n= 6/81; 7,4%) come pollo cotto e affettato e carne di pollo non RTE (n= 5/81; 61,7%) (Figura 17).



**Figura 17:** Provenienza e tipologia di campioni positivi per *S. enterica* non tifoidea

Tra i campioni originari dell'Asia, la maggior parte delle foglie (*betel*, *paan*, etc.) contaminate è risultata provenire da India (68/180; 37,8%), Laos (39/180; 21,7%), Bangladesh (35/180; 19,4%), Thailandia (20/180; 11,1%) e Malesia (10/180; 5,6%). Il 93,3% (n=14/15) degli alimenti destinati ad animali domestici (*pet-food*) e il 92,7% (n=51/55) dei campioni positivi di pollo erano provenienti dalla Thailandia.

Tra i campioni dal Sud America, la maggior parte dei campioni di pollo (237/253; 93,6%) e la totalità di quelli di tacchino (12/12; 100%) sono risultati provenienti dal Brasile. Una piccola percentuale di campioni di pollo proveniva anche dal Cile (14/251; 5,6%). I campioni di foglie, invece, sono risultati provenienti dalla Cambogia (6/9; 66,7%) e dalla Repubblica Dominicana (3/9; 33,3%).

Il 46,9% (n=38/81) dei campioni positivi per *S. enterica* non tifoidea provenienti dal Regno Unito erano *swab*, mentre la restante parte era costituita da campioni di cibo, in particolare da prodotti RTE

composti contenenti pollo (n=16/81; 19,8%), come *sandwich* di pollo, seguiti da pollo RTE (n= 6/81; 7,4%) come pollo cotto e affettato e carne di pollo non RTE (n= 5/81; 61,7%).

Tutti gli isolati di *Salmonella* enterica non tifoidea (n=982) sono stati sottoposti a WGS. Di questi, il 65,1% (n=639) è stato identificato come sottospecie I e includeva 77 diversi serovars.

Per il 34,7% dei campioni, i risultati sono andati persi e non è stato possibile determinare il serovar di appartenenza.

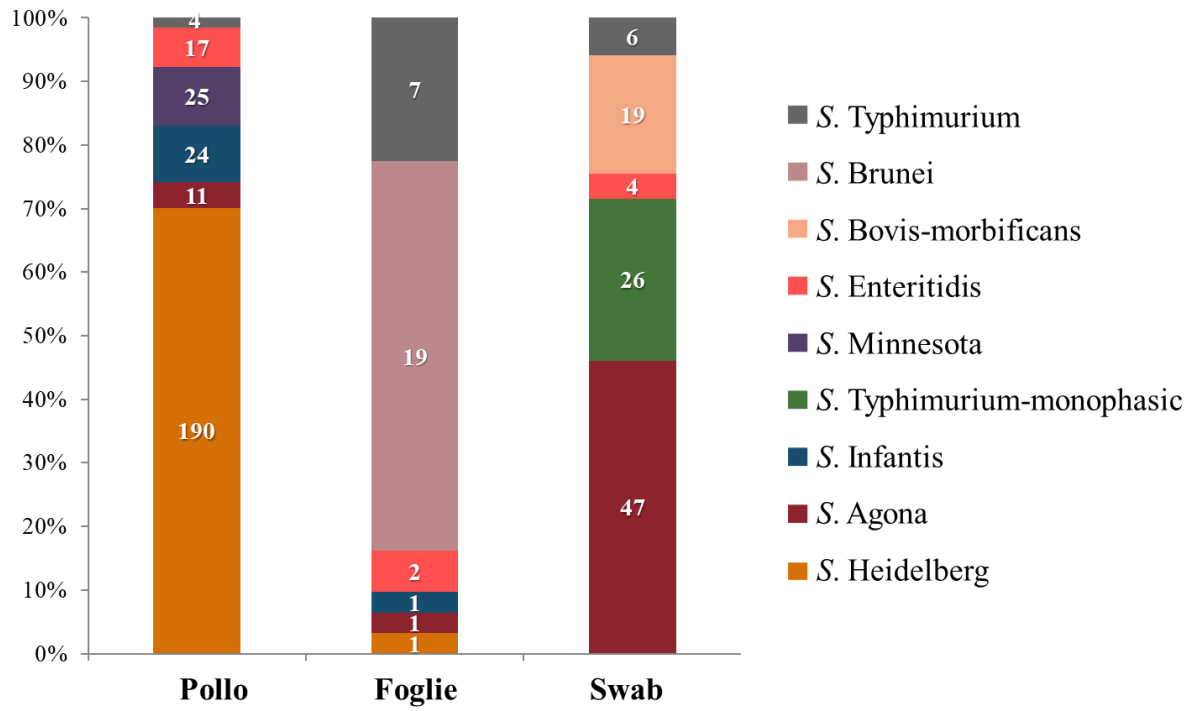
In generale, i dieci *serovars* più comuni sono stati *S. Heidelberg* (191/982, 19,4%); *S. Agona* (n=65/982, 6,6%); *S. Enteritidis* (n=33/982, 3,4%); *S. Infantis* e *S. Typhimurium-monofasic* (per entrambe n=28/982, 2,9%); *S. Minnesota* e *S. Typhimurium* (per entrambe n=25/982, 2,5%); *S. Bovis-morbificans* (n=21/982, 2,1%); *S. Brunei* (n=19/982, 1,9%) e *S. Braenderup* (n=11/982, 1,1%) (Tabella 14).

L'Asia è stato il Paese con la maggiore variabilità in termini di *serovars*. L'89,5% di *S. Brunei* e l'80% di *S. Albany* era proveniente dall'Asia, mentre il 96,9% di *S. Heidelberg* dal Sud America, come il 96% di *S. Minnesota* e il 67,9% di *S. Infantis*. Il 90,4% del serovar *Bovis-morbificans* ed il 33,8% di *S. Agona* era proveniente dal Regno Unito.

Riguardo i dieci *serovars* prevalenti, il 99,5% di *S. Heidelberg* è stato isolato principalmente in campioni di pollo (n=190/191) (il rapporto è espresso in termini di isolati dello stesso *serovar* in una definita tipologia di campione/numero di ceppi totale del *serovar* specifico), come *S. Infantis* (n=24/26; 92,3%), *S. Minnesota* (n=25/25; 100%), *S. Enteritidis* (n=17/23; 73,9%) e *S. Albany* (n=9; 90%). I serovar *S. Agona*, *S. Typhimurium-monofasic* e *S. Bovis-morbificans* sono stati soprattutto riconducibili ai tamponi (n=47/60, 78,3%), (n=26/26, 100%) e (n=19/19, 100%) rispettivamente. *S. Brunei* è stato isolato solo da campioni di foglie (n= 19/19, 100%). *S. Typhimurium*, invece, è stato il serovar più ubiquitario, essendo stato osservato in campioni di foglie (n=7/17, 41%), *swab* (n=6/17, 35,3%) e campioni di pollo (n=4/17, 23,5%) (Figura 18).

**Tabella 14:** Prevalenza dei serovars identificati nei campioni positivi per *S. enterica* non tifoidea

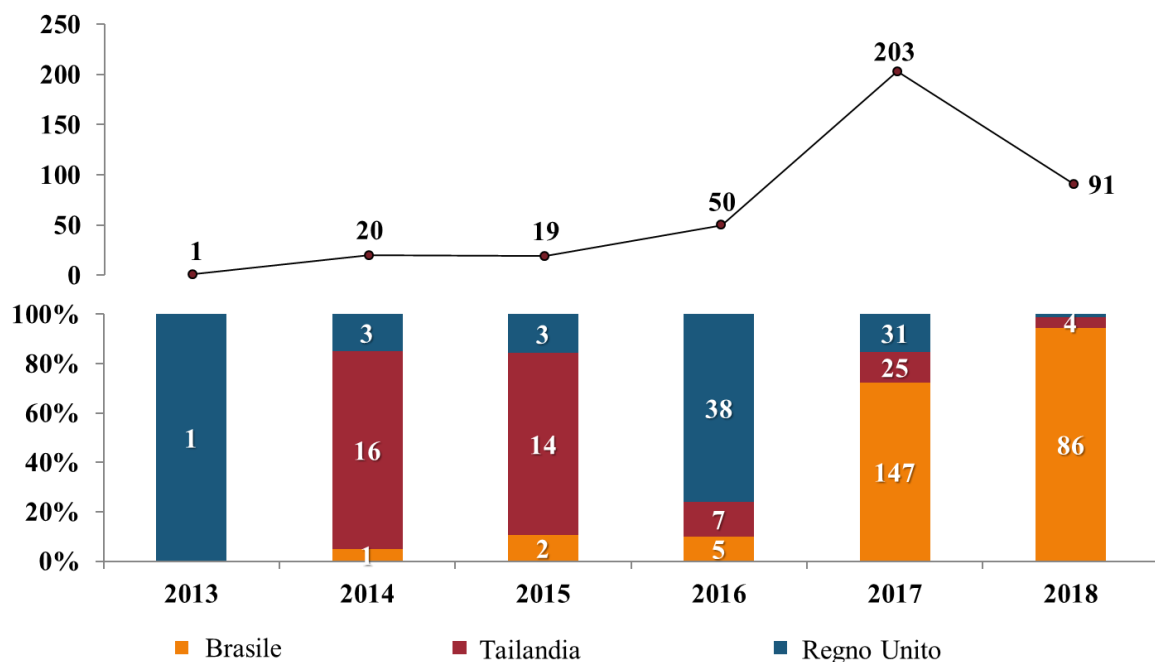
<i>Serovars</i>	N	Prevalenza		
Heidelberg	191	19,5%	Java	2 0,2%
Agona	65	6,2%	Molade	2 0,2%
Enteritidis	33	3,4%	Mount-pleasant	2 0,2%
Infantis	28	28,5%	Ohio	2 0,2%
Typhimurium-monophasic	28	28,5%	Stanleyville	2 0,2%
Minnesota	25	2,5%	Thompson	2 0,2%
Typhimurium	25	2,5%	Amsterdam	1 0,1%
Bovis-morbificans	21	2,1%	Anatum	1 0,1%
Brunei	19	1,9%	Binza	1 0,1%
Braenderup	11	1,1%	Bleadon	1 0,1%
Albany	10	1,0%	Derby	1 0,1%
Newport	10	1,0%	Guildford	1 0,1%
Weltevreden	10	1,0%	Hadar	1 0,1%
Mbandaka	9	0,9%	Hofit	1 0,1%
Bareilly	8	0,8%	Houten	1 0,1%
Hvittingfoss	8	0,8%	Idikan	1 0,1%
Virchow	8	0,8%	Karamoja	1 0,1%
Javiana	6	0,6%	Kasenyi	1 0,1%
Unnamed	6	0,6%	Lanka	1 0,1%
Dublin	5	0,5%	Larochelle & Infantis	1 0,1%
Gold-coast	5	0,5%	Llandoff	1 0,1%
Kedougou	5	0,5%	Meleagridis	1 0,1%
London	5	0,5%	Morehead	1 0,1%
Rissen	5	0,5%	Napoli	1 0,1%
Saint-paul	5	0,5%	Oranienburg	1 0,1%
Unnamed	5	0,5%	Oranienburg	1 0,1%
Kentucky	4	0,4%	Orion	1 0,1%
Muenchen	4	0,4%	Ramat-gan	1 0,1%
Rubislaw	4	0,4%	Ruiru	1 0,1%
Senftenberg	4	0,4%	San-diego	1 0,1%
poona	3	0,3%	Saphra	1 0,1%
Richmond	3	0,3%	Tamberma	1 0,1%
Stanley	3	0,3%	Teko	1 0,1%
Uzaramo	3	0,3%	Urbana	1 0,1%
Arizonae	2	0,2%	Westhampton	1 0,1%
Chester	2	0,2%	Westminster	1 0,1%
Cubana	2	0,2%	Weston	1 0,1%
Fulica	2	0,2%		
Gaminara	2	0,2%		
Give	2	0,0%		
			<b>Totale</b>	<b>639</b> 65,1%
			<b>Non definito</b>	<b>343</b> 34,9%
			<b>Totale campioni positivi</b>	<b>982</b>



**Figura 18:** Principali serovars nei campioni maggiormente contaminati da *S. enterica* non tifoidea

### 5.3.3 Prevalenza dei determinanti di resistenza valutati mediante WGS

L'analisi dei dati di antibiotico-resistenza ha riguardato un sottoinsieme (n=384) di ceppi di *S. enterica* non tifoidea. In dettaglio, sono stati selezionati per l'analisi solo i campioni provenienti da Regno Unito (n=77), Thailandia (n=61) e Brasile (n=240). I dati erano, infatti, più omogenei in termini di completezza ed anche più rappresentativi di regioni geografiche molto diverse e lontane tra loro. L'analisi è stata incentrata sulla provenienza dei differenti *serovars* e dei determinanti di resistenza. Dei 384 campioni selezionati, uno solo è stato isolato nel 2013 ed era proveniente dal Regno Unito, mentre l'80% (n=16/20) dei campioni del 2014 proveniva dalla Thailandia, come per il 2015 (n=14/19, 73%). Il 76% (n=38/50) dei campioni relativi al 2016 era proveniente dal Regno Unito ed il 14% (n=7/50) dalla Thailandia. Nel 2017 è stato registrato un picco di raccolta di campioni positivi a *S. enterica* non tifoidea. I campioni originari dal Brasile sono risultati prevalenti (n=147/203, 72,4%) nel 2017, seguiti dal 15,3% (n=31/203) dal Regno Unito e dal 12,3% (n=25/203) dalla Thailandia. Nel 2018, il 94,5% (n=86/91) dei campioni era proveniente dal Brasile (Figura 19).



**Figura 19:** Origine e distribuzione dei 384 campioni considerati nel periodo 2013-2018



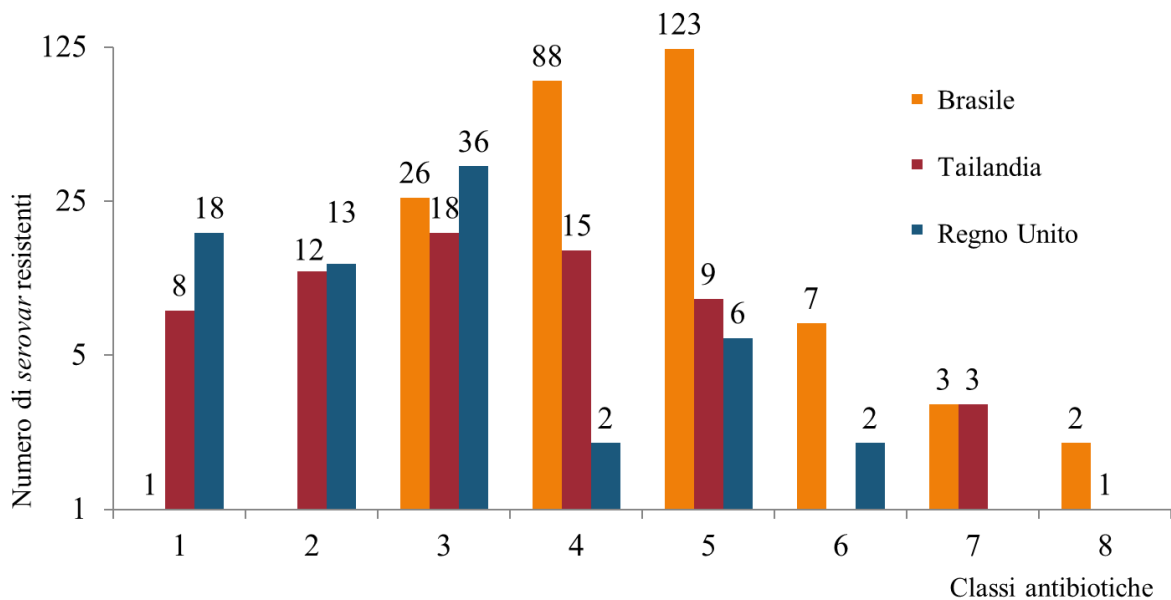
Tutti i campioni di *swab* (n=38) e di panno (n=1) erano provenienti dal Regno Unito, come tutti gli alimenti composti RTE o di origine animale ed i campioni di pesce non RTE. Dal Brasile erano provenienti principalmente alimenti di origine animale non RTE (n=236/229, 81,1%), mentre il 77,8% (n=7/9) degli alimenti per animali domestici e il 69,2% (n=9/13) di prodotti di origine non animale RTE dalla Thailandia.

*S. Heidelberg* è stato il *serovar* prevalente nei campioni del Brasile (n=201/241, 83%), seguito da *S. Minnesota* (n=24/241, 10%) ed altri *serovars* minori, come *S. Agona*, *S. Saintpaul*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Give* e *S. Schwarzengrund*. Il *serovar* più frequente nei campioni dalla Thailandia è stato *S. Enteritidis* (n=14/66, 21,2%), seguito da *S. Albany* (n=8/66, 12,2%) e *S. Agona* (n=6/66, 9,1%) e *serovars* minori. *S. Agona* è stato il *serovar* maggiormente identificato nei campioni del Regno Unito (n=22/77, 28,6%), seguito da *S. Branderup* (n=21/77, 27,3%), *S. Bovis-morbificans* (n=19/77, 24,7 %) e altri *serovars* minori.

Attraverso il WGS dei 384 campioni selezionati, è stato analizzato il profilo genetico per stabilire la prevalenza di determinanti implicati nella resistenza verso 12 classi di antibiotici considerati (aminoglicosidi, chinoloni, macrolidi,  $\beta$ -lattamici, trimetoprim, fosfomicina, tetracicline, sulfamidici, amfenicoli, rinfamicina, carbapenemi, acido fusidico). Nessun ceppo ha mostrato i geni codificanti per la resistenza a rinfamicina, acido fusidico e carbapenemi, ma il 61,2% (n=235) ha presentato una o più  $\beta$ -lattamasi (CMY-2, CMY-18, CMY-54, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-55, CTX-M-65, TEM-1, TEM-117-p\*, TEM-135, TEM-191-p\*, blaBIL-1[u], CARB-2, CTX-M-55, ACT-24[v]). Quasi tutti i ceppi (n=380/384, 99%) sono risultati positivi per i geni associati alla resistenza agli aminoglicosidi (*aac(6')-Iy*, *aac(3)-Via*, *aadA-12*, *aadA-1*, *aac(6')-Iaa*, *aac(3)-IId*, *aadA-2*, *aph(6)-Id*, *aph(4)Ia*, *strB*, *strA*, *aadA-1b*, *aadD*, *aadA-8b*, *aadA-17*, *aadA-13\**). Inoltre, nell'89,8% (n=345/380) è stata osservata la presenza di geni di resistenza nei confronti dei chinoloni (*parC*, *gyrA*, *qnrB-19*, *qnrS-1*), mentre il 65,1% (n=250/384) ed il 59,1% (n=227/384) hanno mostrato i determinanti implicati rispettivamente

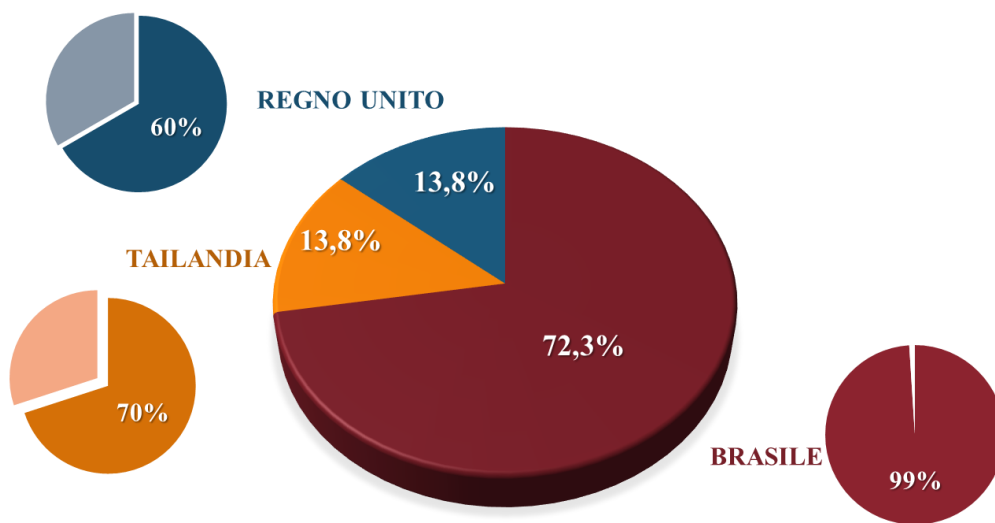
nella resistenza alla tetraciclina (*tet(A)*, *tet(A)-I*, *tet(D)*, *tet(G)*, *tet(J)*) e al sulfametossazolo (*sul-1*, *sul-2*, *sul-3*). Il 9,6% (n=37/384) è risultato positivo ai determinanti di resistenza per i macrolidi (*lnu-(A)*, *sat2A*, *mph-(B)*); il 5,2% (n=20/384) e l'1,5% (n=6/384) a quelli associati rispettivamente alla resistenza a trimetoprim (*dfrA-1*, *dfrA-14*, *dfrA-8*, *dfrA-12*) e al cloramfenicolo (*floR*, *catA-2*, *cml-1\**, *FOSa[V]*). Solo un ceppo (0,2%) ha presentato il gene *fosA* codificante per la resistenza alla fosfomicina.

Per quanto riguarda i profili di resistenza, tre ceppi (due dal Brasile; uno dalla Thailandia) hanno mostrato resistenza a 8 classi di antibiotici, includendo aminoglicosidi, chinoloni, macrolidi,  $\beta$ -lattamici, trimetoprim, tetraciclina, sulfamidici e amfenicoli; 4 ceppi sono risultati resistenti a 7 classi di antibiotici (25% da Brasile e 75% da Thailandia) e 8 ceppi presentavano resistenza a 6 classi di antibiotici. Il 34,4% (n=132/384) era resistente a 5 classi. A quattro classi sono risultati resistenti 105 ceppi (27,3%). Il 23,1% (n=80/384) era resistente a tre classi e il 6,5% (n=25/384) e il 7% (n=27/384) rispettivamente a due e una classe di antibiotici.



**Figura 20:** Numero di classi di antibiotici verso le quali è stata osservata la resistenza nei ceppi di *S. enterica* non tifoidea in base alla provenienza

Sono stati definiti MDR i ceppi che presentano resistenza a più di tre classi di antibiotici, che sono stati l'86,5% (n=332/384). Di questi, il 13,8% (n= 46/332) era proveniente dal Regno Unito e dalla Tailandia e il 72,3% (n=240/332) dal Brasile. Il 99% dei ceppi dal Brasile è risultato MDR, mentre il 70% e il 60% rispettivamente di quelli provenienti da Tailandia e dal Regno Unito (Figure 21-22).

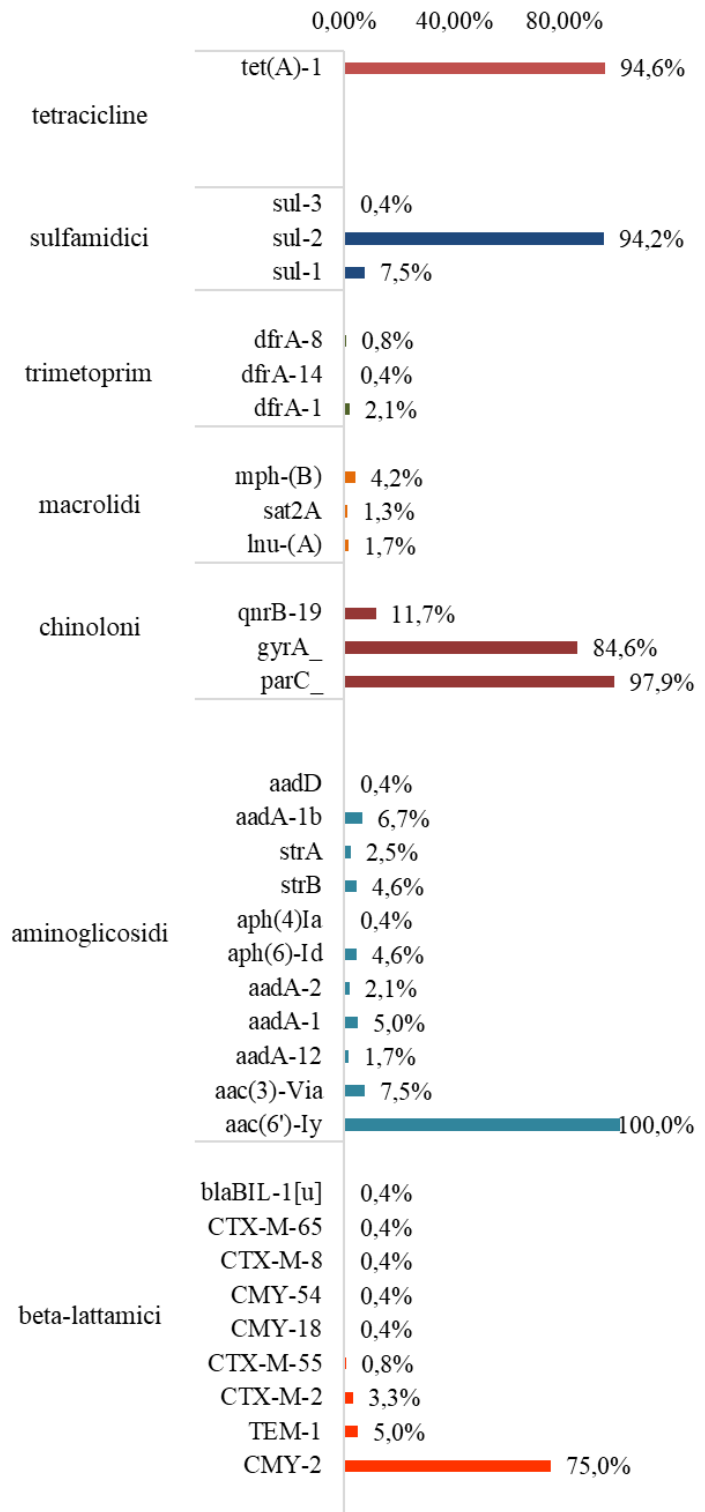


**Figura 21:** Prevalenza di ceppi MDR per Paese di provenienza

	Numero classi antibiotiche								totale
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>Brasile</b>	<b>1</b>		<b>26</b>	<b>82</b>	<b>122</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>240</b>
S. Agona			5						
S. Enteritidis			1						
S. Give	1								
S. Heidelberg			16	78	98	4	3	2	
S. Infantis			2			1			
S. Minnesota				4	20				
S. Saintpaul					4				
S. Schwarzengrund			1						
S. Unnamed			1						
<b>Tailandia</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>66</b>
S. Agona				1	5				
S. Albany				5	2		1		
S. Binza								1	
S. Bleadon			1						
S. Braenderup		3							
S. Enteritidis		6	3	5					
S. Give	1								
S. Houten			1						
S. Hvittingfoss	1	1							
S. Idikan			1						
S. Kedougou	5								
S. Kentucky			1						
S. Mbandaka			1						
S. Minnesota					1				
S. Mount-pleasant			1						
S. Ohio			2						
S. Poona			2						
S. Ramat-gan			1						
S. Rissen							2		
S. Senftenberg			2		1				
S. Stanley			1						
S. Typhimurium	1	1		2					
S. Virchow			1						
S. Weltevreden		1		2					
<b>Regno Unito</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>2</b>			<b>77</b>
S. Agona		10	12						
S. Anatum			1						
S. Bovis-morbificans	17	2							
S. Braenderup	1		19		1				
S. Enteritidis		1							
S. Gold-coast			1						
S. Hadar				1					
S. Infantis				1	1				
S. Java						1			
S. Larochelle					1				
S. Livingstone			1						
S. Newport			1						
S. Typhimurium			1						
S. Typhimurium - monophasic					3	1			
	profilo - Multi Drug Resistant								

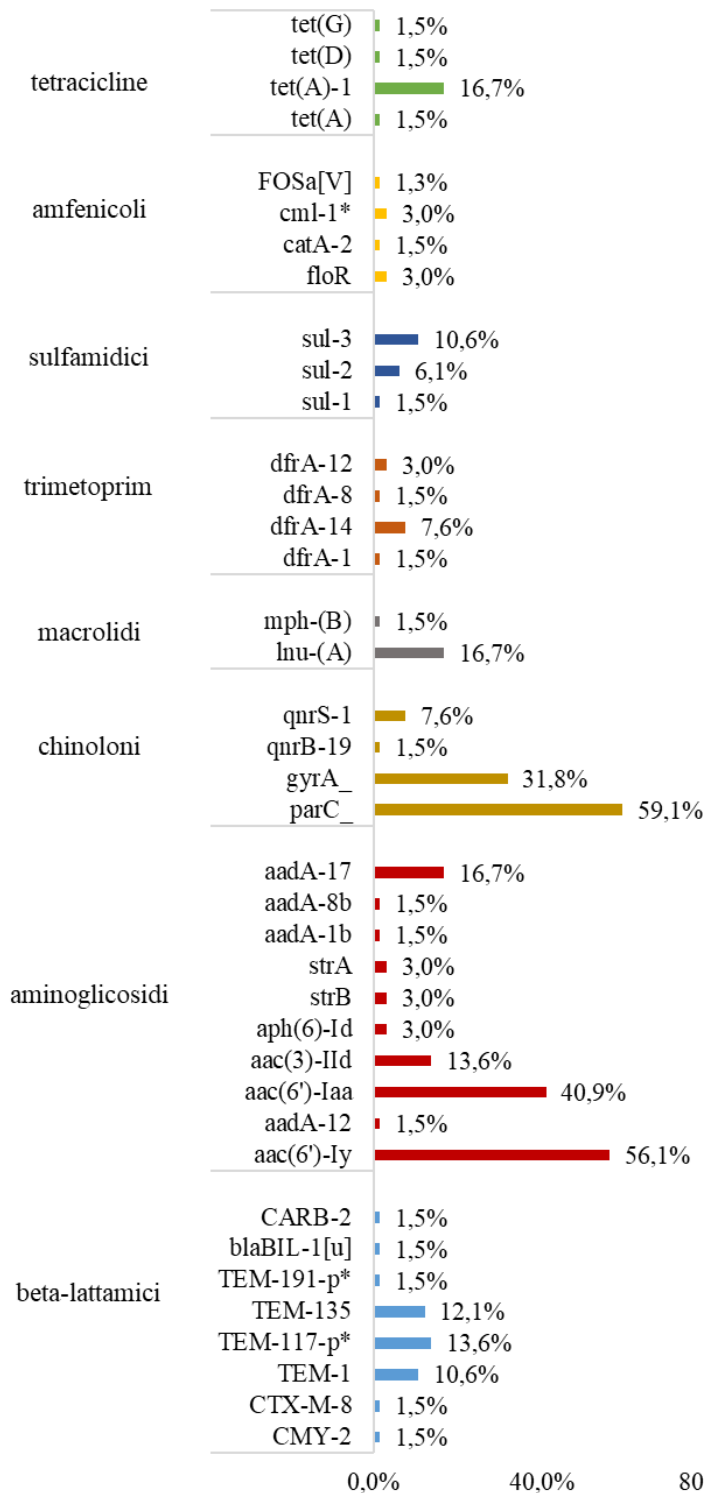
**Figura 22:** Numero di ceppi che hanno presentato un profilo MDR categorizzati per classi di antibiotici e *serovar*

Tutti i campioni provenienti dal Brasile contaminati da *S. enterica* non tifoidea sono risultati positivi alla  $\beta$ -lattamasi CMY-2 e *aac(6')-ly* implicato nella resistenza agli aminoglicosidi. Quasi il totale dei ceppi ha, inoltre, presentato i geni *parC* (n=235/240; 97,9%) e *gyrA* (n=203/240; 85,6%), entrambi coinvolti nella resistenza ai chinoloni; *sul-2* (n=226/240; 94,2%) associato alla resistenza al sulfametossazolo e *tet(a)-1* (n=227/240; 94,6%), determinante di resistenza alla tetraciclina (Figura 23).



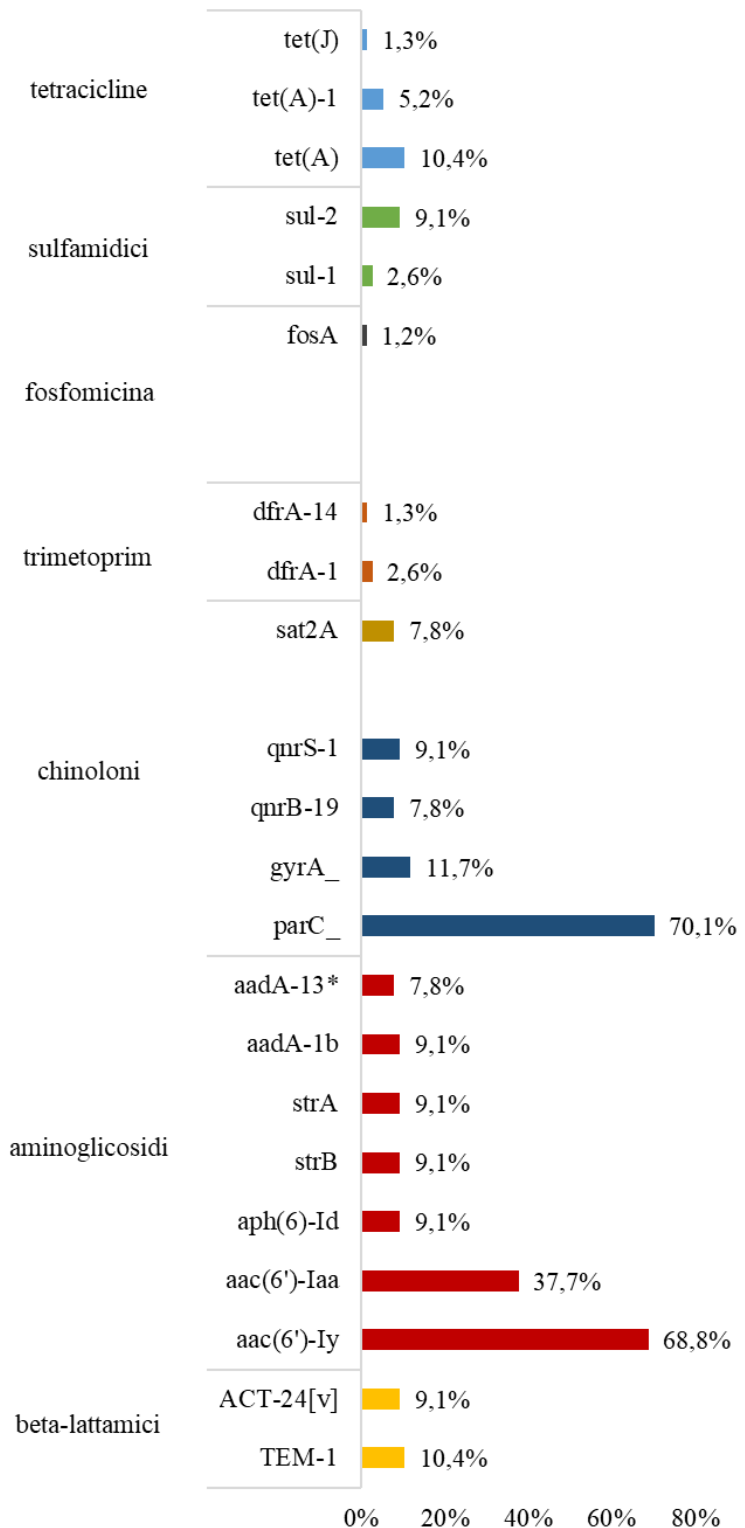
**Figura 23:** Prevalenza dei determinanti di resistenza negli isolati da campioni provenienti dal Brasile

Tra i 66 ceppi isolati da campioni provenienti dalla Thailandia, quasi tutti sono risultati ai determinanti associati alla resistenza verso aminoglicosidi (n=64/66, 97%). In particolare, i determinanti di resistenza sono stati *aac(6')ly* e *aac(6')laa*, rispettivamente osservati nel 56,1% (n=37/66) e 40,9% (n=27/66) degli isolati. Il 42,2% è, inoltre, risultato positivo alle  $\beta$ -lattamasi, con tre determinanti maggiormente coinvolti, quali TEM-1 (n=7/66; 10,6%), TEM-117p\* (n=9/66; 13,6%) e TEM-135 (n=8/66; 12,1%). L'81,8% (n=54/66) presentava i determinanti di resistenza ai chinoloni mostrando le varianti geniche di *parC* e *gyrA*, rispettivamente nel 59,1% (n=39/66) e nel 31,8% (n= 21/66) degli isolati (Figura 24).



**Figura 24:** Prevalenza dei determinanti di resistenza negli isolati da campioni provenienti dalla Thailandia

Dei 77 isolati da campioni provenienti dal Regno Unito, il 68,8% (n=53/77) e il 37,7% (n=29/77) sono risultati positivi rispettivamente per *aac(6')ly* e per *aac(6')Iaa*, che conferiscono resistenza agli aminoglicosidi. Il 9,1% (n=7/77) ha mostrato i determinanti implicati sia nella resistenza verso i  $\beta$ -lattamici, per la presenza del determinante ACT-24, sia verso il sulfametossazolo con *sul-2*. Il 70,1% (n=54/77) ha mostrato, inoltre, varianti di *parC* associato alla resistenza ai chinoloni. Solo un ceppo ha presentato il gene *fosA* codificante per la resistenza alla fosfomicina (Figura 25).



**Figura 25:** Prevalenza dei determinanti di resistenza negli isolati da campioni provenienti dal

## 6. Discussione

La rapida diffusione della resistenza agli antibiotici in batteri che causano infezioni nell'uomo è ad oggi un problema di dimensioni globali. A partire dal 2050, sono stimati 10 milioni di decessi ogni anno a causa di infezioni sostenute da batteri MDR, molte di più di quelle dovute al cancro (8,2 milioni) (O'Neill J et al., 2016). Con l'emergenza di patogeni multiresistenti è sempre più evidente la necessità di implementare strategie rapide e sensibili per l'identificazione precoce ed il controllo della diffusione. In questo scenario, l'utilizzo di metodi di tipizzazione molecolare rappresenta un valido approccio per definire la struttura di una popolazione batterica; per tracciare le fonti di infezione e definire i meccanismi di trasmissione; per aumentare le conoscenze riguardo l'epidemiologia di tali infezioni, in termini di prevalenza, incidenza e persistenza, e per implementare interventi razionali per il controllo e la gestione di eventuali focolai in ambito ospedaliero e/o in comunità (Donnarumma F et al., 2011).

### 6.1. Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare

#### di *K. pneumoniae*

Una parte di questo lavoro di tesi descrive i risultati ottenuti dalla caratterizzazione biomolecolare di ceppi di *K. pneumoniae* isolati nel periodo 2014-2017 nell'ambito del sistema di sorveglianza degli "Alert organisms" implementato presso il Presidio Ospedaliero "A. Cardarelli" di Campobasso, Regione Molise. I risultati dello studio hanno evidenziato come questo batterio Gram-negativo sia maggiormente isolato da pazienti di età avanzata e dal reparto di terapia intensiva, dove le procedure e l'utilizzo di *devices* invasivi giocano un ruolo cruciale



nell'insorgenza di tali infezioni (Giani T et al., 2015; Cristina ML et al., 2016; Codjoe FS et al., 2018).

Lo studio ha riguardato 24 ceppi di *K. pneumoniae*, nei quali sono stati individuati 21 profili di resistenza, sottolineando l'elevata diversità fenotipica intra-specie. Tutti gli isolati hanno presentato, inoltre, un profilo MDR, con una elevata prevalenza di resistenza verso i carbapenemi (76,9%) e la colistina (73%), anche se è importante sottolineare, ancora una volta, che i microrganismi sono stati isolati e segnalati nell'ambito di un sistema di sorveglianza per 'Alert organisms'.

Sebbene sia da segnalare un'elevata suscettibilità dei ceppi alla fosfomicina (92%), antibiotico recentemente preso in considerazione per il trattamento di infezioni sostenute da patogeni XDR, desta preoccupazione il fatto che anche verso questo antibiotico stia emergendo una resistenza mediata dal gene *fosA*, il quale può essere trasferito mediante plasmidi tra i batteri delle *Enterobacteriaceae* (Klontz EH et al., 2017).

Ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi si sono diffusi rapidamente in ambito ospedaliero in tutto il mondo, inclusa l'Italia, dove sono in continuo aumento, passando da una prevalenza del 2% nel 2009 al 19% nel 2012, fino a raggiungere il 34,3 % nel 2013 (European Centre for Disease Prevention, 2010, 2014; Sisto A et al., 2012).

La colistina negli ultimi anni è stata presa nuovamente in considerazione come scelta terapeutica per individuare farmaci alternativi ai carbapenemi, sebbene recenti studi abbiano riportato un'emergente resistenza anche ad essa, sia a livello mondiale, sia a livello nazionale (Monaco M et al., 2014). La comparsa e la diffusione di questa nuova resistenza, aggiuntiva a quella nei confronti dei carbapenemi, rende il problema degli Enterobatteri produttori di carbapenemasi ancora più allarmante per la salute pubblica. Il trattamento con colistina e, soprattutto, la durata dello stesso, sono tra i principali fattori di rischio per l'aumento della prevalenza di ceppi resistenti. Alcuni batteri Gram-negativi multiresistenti sono considerati intrinsecamente non-suscettibili alla colistina, come *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*

(Kontopidou F et al., 2011). Ulteriore motivo di preoccupazione è anche la concomitante resistenza alla colistina in *A. baumannii* (Qureshi ZA et al., 2015), microrganismo frequentemente isolato in casi di colonizzazione/infezione nei pazienti ricoverati in terapia intensiva o in condizioni critiche. Quindi, con l'aumento del ricorso alla colistina per il trattamento di infezioni sostenute da patogeni Gram-negativi multiresistenti, è altamente probabile che anche la diffusione della resistenza ad essa sia destinata ad aumentare drasticamente nel contesto assistenziale (Mammina C et al., 2012), contribuendo alla selezione e alla diffusione di ceppi resistenti che, in breve tempo, potrebbero passare da essere classificati come multiresistenti (MDR) a estensivamente resistenti (XDR), e addirittura a pan-resistenti (PDR) (Granata G et al., 2017; Rello J et al., 2018; Jafari Z et al., 2019).

L'analisi in questo studio ha evidenziato un'elevata prevalenza di ceppi resistenti alla colistina, che è risultata molto più alta rispetto a quella riportata da altri studi italiani, compresa tra il 36% e il 50% (Giani T et al., 2015; Giordano C et al., 2019; Moradigaravand D et al., 2017; Lomonaco S et al., 2018), sebbene il dato ottenuto potrebbe essere sovrastimato in quanto basato solo su 'Alert organisms' con profilo MDR. KPC, codificata dal gene *bla<sub>KPC</sub>* e tutte le sue varianti, è la carbapenemasi principalmente riportata negli isolati di *K. pneumoniae* e presenta un'attività contro tutti i  $\beta$ -lattamici. Negli ultimi anni, tale enzima è stato riscontrato in numerose altre specie batteriche, come *E. coli*, *Enterobacter* e *Proteus* (Kopotsa K et al., 2019). Da quando è stata individuata per la prima volta nel 2001 (Arnold RS et al., 2011), i batteri produttori di KPC hanno determinato numerosi *outbreaks* in molti Paesi dell'Asia, Nord America, Africa e anche in Europa (Codjoe F et al., 2018). Nello studio, *bla<sub>KPC</sub>* è stato riscontrato in tutti i ceppi di *K. pneumoniae* analizzati, in linea con i dati nazionali che riportano livelli endemici di tale determinante di resistenza (Sabbatucci M et al., 2018). In Italia, gli enzimi KPC sono stati segnalati per la prima volta alla fine del 2008, in un paziente che aveva soggiornato in Israele e che aveva presentato un'infezione intra-addominale. La seconda segnalazione dell'isolamento di KPC, invece, è avvenuta nel 2009 e ha riguardato due pazienti

ricoverati in un ospedale di Roma (Girmania C et al., 2016). Da allora, ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC hanno subito una rapida ed ampia diffusione, con diverse segnalazioni di focolai epidemici nel *setting* ospedaliero dal nord al sud Italia (Girmania C et al., 2016). Il problema della resistenza ai carbapenemi in Italia si sta ulteriormente aggravando dall'emergenza di ceppi resistenti alla colistina e contemporaneamente produttori di KPC (Canton R et al., 2012).

La carbapenemasi VIM codificata dal gene *bla<sub>VIM</sub>* è risultata presente nel 70% dei ceppi analizzati. Questa MβL è la carbapenemasi di classe B più comunemente isolata a livello globale e l'Italia è stato il primo Paese del bacino del Mediterraneo a segnalarne la presenza di isolamenti sporadici in *K. pneumoniae* (Girmania C et al., 2016). Da allora, isolamenti occasionali o eventi epidemici a livello ospedaliero causate da enzimi VIM sono stati descritti su tutto il territorio nazionale. Tra le prime segnalazioni sulla presenza di ceppi produttori di VIM, vi è stata quella relativa a un *outbreak* causato da ceppi multiresistenti di *K. pneumoniae*, verificatosi in tre reparti di un ospedale di Genova tra settembre 2004 e marzo 2005 (Cagnacci S et al., 2007). La presenza di VIM in *K. pneumoniae* non ha subito un'ampia diffusione negli altri Paesi del Mediterraneo, ad eccezione della Grecia, dove diversi casi sporadici e focolai epidemici sono stati segnalati negli ultimi anni (Girmania C et al., 2016).

Nei ceppi in studio, inoltre, è importante sottolineare l'assenza di NDM-1 e OXA-48, come quella di IMP e GES, analogamente a quanto riportato dai dati nazionali che, ad oggi, hanno riportato solo casi sporadici (Day MJ et al 2019).

A livello globale, lo scenario attuale è preoccupante per la continua diffusione di KPC in *K. pneumoniae* in associazione con i cloni ST258 e ST512, responsabili di importanti e numerosi eventi epidemici (Munoz-Price LS et al., 2013), mentre VIM, sebbene sia stata segnalata, resta una carbapenemasi non ancora ampiamente diffusa in Italia (Cantón R et al., 2012).

La resistenza alla penicillina in *K. pneumoniae* è stata segnalata per la prima volta all'inizio gli anni '60, portando all'identificazione delle prime β-lattamasi, *bla<sub>SHV-1</sub>* e *bla<sub>TEM-1</sub>*. Due decenni

dopo la prima ESBL, in *K. pneumoniae* è stato identificato *bla<sub>SHV-2</sub>* in un paziente ricoverato in terapia intensiva in Germania (Kliebe C et al., 1985; Navon-Venezia S et al., 2017). Il gene *bla<sub>SHV</sub>* ha mostrato un'attività a spettro esteso contro i  $\beta$ -lattamici, comprese le cefalosporine di terza generazione e i monobattami. Poco dopo, un'altra variante di ESBL mediata da plasmidi, *bla<sub>TEM-3</sub>*, riconducibile a questo patogeno è stata riportata in Francia (Sirot D et al., 1987; Navon-Venezia S et al., 2017). Da allora, *K. pneumoniae* è divenuto il patogeno maggiormente associato ad epidemie e produttore di ESBL. Negli ultimi 30 anni, le ESBL hanno raggiunto livelli endemici in tutto il mondo, compresa l'Italia (Calbo E, Garau J, 2015). I risultati ottenuti dallo studio dei 26 ceppi di *K. pneumoniae* riguardanti la presenza di tali determinanti di resistenza sono in linea con altri studi, nei quali è stato riportato che i geni *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*, che sono stati riscontrati con una maggiore prevalenza, sono frequentemente associati a infezioni sostenute da *K. pneumoniae* (Corbella M et al., 2018; Shakib P et al., 2018), diversamente da *bla<sub>CTX-M</sub>* che risulta prevalente negli isolati di *E. coli* (Day MJ et al., 2016). L'identificazione di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di ESBL nel *setting* ospedaliero dovrebbe essere seguita da interventi di controllo, mediante il rafforzamento delle pratiche di igiene delle mani negli operatori sanitari e della *compliance* alle linee guida della *stewardship* antimicrobica, nonché attraverso la rimozione di dispositivi contaminati, come respiratori, cateteri vescicali e venosi, etc. (Habboush Y et al., 2018)

Anche l'aumento dei casi di infezione da batteri resistenti alla colistina (col-R) è considerato un problema a livello mondiale, proprio per l'uso che oggi si fa della colistina come antibiotico di ultima linea. In Italia, studi retrospettivi condotti nel periodo gennaio 2010-giugno 2014 hanno riportato un incremento di tre volte della resistenza alla colistina nei ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC isolati da emocoltura e il 51% di mortalità a 30 giorni dall'insorgenza della sepsi (Giacobbe DR et al 2015).

Nel presente studio, nei ceppi col-R, non sono state evidenziate le varianti *mcr-1-2-3-4-5-6-7-7.1-8*, in accordo con studi precedenti che hanno riportato tali determinanti maggiormente in *E.*

*coli* rispetto a *K. pneumoniae* (Wise MG et al., 2018). Il 95% circa dei ceppi col-R analizzati ha, invece, mostrato alterazioni del gene cromosomale *mgrB*, che è coinvolto nell'acquisizione di un fenotipo di resistenza alla colistina. L'inattivazione di *mgrB* da parte di *IS*, in particolare di *IS5-like* e *ISKpn14*, è stato osservato nel 31,6% dei ceppi col-R. Questo meccanismo di resistenza è stato già riportato in altri studi (Cannatelli A et al., 2014; Poirel L et al., 2015). Il trasferimento di sequenze di inserzione o trasposoni tra genomi e plasmidi è considerato il meccanismo più importante per l'acquisizione della diversità genetica, della resistenza e dell'evoluzione batterica (Siguier P et al., 2014). È stato segnalato che, alla base dell'acquisizione della resistenza agli antibiotici, quindi anche alla colistina, vi sia il trasferimento di elementi mobili all'interno dell'intestino dell'ospite (Huddleston JR et al., 2014), teoria che è stata confermata da studi *in vitro* (López-Camacho E et al., 2014).

In tre isolati, la proteina MgrB è risultata troncata a causa della delezione di un singolo nucleotide che ha causato una mutazione *frameshift* e una prematura interruzione della catena proteica per la presenza di un codone di stop. Tale meccanismo è stato già precedentemente riportato (Esposito EP et al., 2018). Nove isolati hanno, invece, presentato una proteina non funzionale a causa di mutazioni puntiformi e la conseguente sostituzione di un singolo amminoacido (V32G, T21N e W20Stop), classificata come deleteria, come riportato in altri studi (Giani T et al., 2015; Pitout JDD et al., 2015; Esposito EP et al., 2018). Ad ulteriore supporto del ruolo di *mgrB* nella resistenza alla colistina, sono stati condotti studi di complementazione con un gene *wild-type* dimostrando che la suscettibilità alla colistina può essere ripristinata con successo (Esposito EP et al., 2018). Nello studio, infine, un solo ceppo col-R, il KP6, ha mostrato un gene *wild-type*, suggerendo la presenza di mutazioni in altri geni all'interno dello stesso sistema di segnalazione Pmr o mediante meccanismi alternativi ancora sconosciuti.

La PFGE ha rivelato un alto livello di diversità tra i ceppi, sottolineando l'elevato potere discriminante della tecnica, ancora considerata ampiamente valida per la genotipizzazione

batterica. I ceppi analizzati sono stati separati in diversi cluster epidemici; tra essi, il cluster VIII ha raggruppato il 77% di ceppi resistenti alla colistina, quattro dei quali sono stati isolati tra dicembre 2014 e gennaio 2015 in pazienti ricoverati all'interno della terapia intensiva e che hanno anche mostrato lo stesso pulsotipo e trasposone (*IS5like*) in *mgrB*. In particolare, il cluster VIII ha compreso i ceppi KP8 (data di isolamento 17/11/14), KP12 e KP14 (data di isolamento 5/1/15) e KP18 (data di isolamento 12/1/15), isolati durante un focolaio epidemico verificatosi nel reparto di terapia intensiva, che è stato verosimilmente correlato a un basso livello di *compliance* con le procedure igieniche standard a causa della ridotta disponibilità del personale sanitario a ridosso del periodo festivo.

La metodica MLST ha indicato la circolazione di ST512, ST101 e ST307, con una maggiore prevalenza di ST512. Questo rappresenta la variante monoallelica di ST258, il clone più frequentemente rilevato in Italia e nel mondo e responsabile dell'ampia diffusione di KPC (Bakour S et al., 2014). Tali risultati sono in linea con altri studi effettuati in Italia (Giani T et al. 2015; Cristina ML et al., 2016; Granata G et al., 2017). Al ceppo KP10, non è stato possibile assegnare un ST, poiché mostrava una variante monoallelica di ST307 (4-1-1-52-1-1-7 invece di 4-1-2-52-1-1-7). Ulteriori analisi sono comunque necessarie per confermare l'identificazione di un nuovo ST. L'analisi dei cloni (ST) nel periodo temporale 2014-2017 in cui sono stati raccolti i ceppi ha evidenziato che ST512 è stato il più frequente nel 2014-15, mentre ST101 è risultato prevalente nel 2016-17, suggerendo una modifica della circolazione negli ultimi anni nel Presidio Ospedaliero a cui fa riferimento questo studio. Inoltre, ST101 è stato recentemente associato, insieme a ST512 e ST258, all'ampia diffusione di KPC, in accordo con i dati ottenuti in questo studio in cui tutti i ceppi di *K. pneumoniae* con ST512 e ST101 sono risultati positivi per KPC (Kopotsa K et al., 2019).

La capacità discriminante di PFGE e MLST è stata valutata considerando rispettivamente il numero di pulsotipi ed il numero di ST identificati. La PFGE ha mostrato un ottimo potere discriminante (96%) tanto da essere ancora considerata un metodo valido per le indagini

epidemiologiche sulle malattie infettive, inclusi i focolai in ambito nosocomiale (Giacometti F et al., 2018). La PFGE, che genera un *fingerprinting* del genoma mediante restrizione enzimatica con tagli rari del materiale genetico, è anche un metodo relativamente economico; tuttavia, necessita di tempi lunghi e di operatori specializzati e i risultati potrebbero non essere sempre confrontabili tra laboratori diversi a causa di errori nell'identificazione delle bande, soprattutto quando poco allineate o deboli. Nello studio, MLST è risultato meno discriminante (61%) della PFGE, in accordo con studi precedenti (Giacometti F et al., 2018). Tuttavia, è considerato il metodo di genotipizzazione più adatto per il confronto dei ceppi su ampia scala, fornendo dati sia per studi a livello locale, sia globali, a lungo termine o evolutivi (Giacometti F et al., 2018). Entrambe le tecniche hanno raggruppato i ceppi dello stesso ST nel medesimo cluster; infatti, prendendo come esempio il cluster VIII, esso ha raggruppato isolati dello stesso reparto e assegnati allo stesso ST che presentavano alterazioni identiche in *mgrB*, permettendo così di supportare l'espansione clonale e la trasmissione crociata di Enterobatteri in ambito ospedaliero (Esposito EP et al., 2018).

## 6.2. Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare

### di *A. baumannii*

Il presente lavoro di tesi ha riguardato anche la caratterizzazione bio-molecolare di 24 ceppi di *A. baumannii* isolati da pazienti ricoverati presso il Presidio Ospedaliero “A. Cardarelli” di Campobasso. *A. baumannii* presenta una resistenza intrinseca a molti antibiotici e ciò lo classifica come un batterio emergente nel causare infezioni nosocomiali (Garnacho-Montero J, Timsit J, 2018), soprattutto nel reparto di terapia intensiva (Mohd Sazly LS et al., 2019). Questo microrganismo è caratterizzato da una elevata persistenza nell'ambiente che consente di diffondersi rapidamente, nonché da una straordinaria capacità di sviluppare resistenza a diversi antibiotici (Garnacho-Montero J, Timsit, J, 2018). Il rapido aumento della resistenza in *A. baumannii* negli ultimi decenni ha messo in evidenza la notevole plasticità genomica di questo batterio, che può determinare una difficile gestione dei casi di infezioni (Da Silva GJ et al., 2016). La diffusione di ceppi produttori di carbapenemasi ha determinato un significativo incremento della resistenza, in particolare ai carbapenemi, sottolineando che l'antibiotico-resistenza è un fenomeno sempre più emergente e di dimensioni preoccupanti. Ulteriori meccanismi di resistenza, sebbene meno frequenti, sono rappresentati dalla sovra-espressione di geni codificanti per la  $\beta$ -lattamasi, come AmpC, dalla ridotta permeabilità della membrana esterna e dalla sovra-espressione delle pompe di efflusso, che rappresenta una fase iniziale per lo sviluppo di un fenotipo MDR (Piddock L et al., 2006). Ad oggi, la colistina rappresenta l'unico antibiotico nei confronti del quale i livelli di sensibilità rimangono elevati; tuttavia, il suo impiego è limitato per problematiche di tossicità e, al contempo, anche per il recente incremento di ceppi ad essa resistenti (Cai Y et al., 2012; Agodi A et al., 2015). L'isolamento di ceppi MDR di *A. baumannii* in tutto il mondo sottolinea la necessità e l'importanza di implementare strategie per una rapida identificazione ed un efficace controllo



della loro diffusione. In questo contesto, i metodi di tipizzazione molecolare forniscono un valido supporto, non solo per l'individuazione di ceppi responsabili di focolai in ambito nosocomiale, ma anche per stabilire eventuali protocolli terapeutici ed implementare la sorveglianza epidemiologica (Sammarco ML et al., 2014; Di Tella D et al., 2019). Oltre il 90% dei ceppi analizzati in questo studio sono stati isolati da pazienti con infezioni del tratto respiratorio, seguite da quelle del tratto urinario, coerentemente con altri studi che riportano un'elevata frequenza di isolamento in tali infezioni (Viehman JA et al., 2014; Zhao S et al., 2015; Principe L et al., 2014). La prevalenza di ceppi MDR di *A. baumannii* in pazienti con polmonite acquisita in ambito ospedaliero si colloca in un *range* compreso tra il 40% ed il 95% (Almomani B et al., 2015; Nowak J et al., 2017; Ziółkowski G et al., 2018). Tali patologie rappresentano una causa importante di mortalità e morbilità, soprattutto se sostenute da *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

La totalità dei ceppi esaminati di *A. baumannii* isolati nell'ambito della sorveglianza di '*Alert organisms*' è risultata resistente ai carbapenemi testati (imipenem e meropenem), in accordo con altri studi italiani che evidenziano anche la resistenza a numerosi altri antibiotici (penicilline, cefalosporine, fluorochinoloni, amminoglicosidi) (Brigante G et al., 2012; Dettori M et al., 2014; Caio C et al., 2018).

Le successive analisi molecolari hanno permesso di definire che la resistenza ai carbapenemi in tutti i ceppi di *A. baumannii* è principalmente dovuta alla presenza del gene *bla<sub>OXA-23</sub>*, in accordo con altri studi condotti a livello nazionale (Brigante G et al., 2012; Agodi A et al., 2015), sebbene siano stati rilevanti ulteriori meccanismi, attribuibili al gene *bla<sub>OXA-51</sub>*, anch'esso riscontrato in tutti ceppi. La prevalenza di *bla<sub>OXA-23</sub>* era ampiamente attesa dal momento che i focolai dovuti a ceppi di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi descritti negli ultimi anni in Italia sono stati perlopiù caratterizzati dalla produzione di tale carbapenemasi (Mammìna C et al., 2011; Brigante G et al., 2012; Principe L et al., 2014; Perilli M et al., 2015). Nell'ultimo decennio, la prevalenza del gene *bla<sub>OXA-23</sub>* è, infatti, aumentata repentinamente,

portando ad una drastica riduzione della prevalenza di *bla*<sub>OXA-58</sub> (D'Arezzo S et al., 2011; Brigante G et al., 2012), predominante fino al 2008 nel territorio nazionale (Di Popolo A et al., 2011). Di fatto, il gene *bla*<sub>OXA-58</sub> non è stato riscontrato in nessuno dei 24 ceppi analizzati nello studio.

Tra le carbapenemasi di classe D è stata, anche, indagata la presenza del gene *bla*<sub>OXA-24</sub> risultato assente in tutti i ceppi, in accordo con i dati epidemiologici disponibili, che evidenziano un'elevata prevalenza in Spagna, Brasile, Belgio, Francia, America Latina, Portogallo, USA ed Asia, ma non in Italia (Peleg A et al., 2008; Evans B, Amyes S, 2014). Gli enzimi OXA, che rappresentano le  $\beta$ -lattamasi maggiormente presenti in tale batterio, conferiscono resistenza non solo ai carbapenemi, ma anche a penicilline e cefalosporine. AmpC è normalmente espressa a bassi livelli e non è inducibile; il ruolo nella resistenza ai carbapenemi è principalmente legato alla presenza della sequenza di inserzione *ISAbal1*, che si trova a monte del gene *bla*<sub>AmpC</sub>, che fornisce un promotore per l'iper-produzione di geni codificanti per tali  $\beta$ -lattamasi (Peleg A et al., 2008; Pagano M et al., 2016).

Tra i molteplici determinanti di resistenza esaminati, anche AmpC,  $\beta$ -lattamasi di classe C, è stata riscontrata in tutti i ceppi, confermando il suo notevole contributo nei meccanismi di resistenza alle oximino-cefalosporine (ceftazidime e cefotaxime). Ciò è stato ulteriormente avvalorato dall'assenza di SHV (ESBL), anch'essa implicata nella resistenza a tali antibiotici (Safari M et al., 2015). Le AmpC sono anche affini alle penicilline e resistenti all'azione degli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi (acido clavulanico, sulbactam e tazobactam) (Rodríguez-Martínez JM et al., 2010). Infatti, tutti i ceppi indagati sono anche risultati resistenti agli antibiotici della classe delle penicilline (ampicillina, amoxicillina-clavulonato, piperacillina, piperacillina-tazobactam) e delle cefalosporine (cefazidime, cefotaxime, cefazolina, cefoxitina, cefepime).

Un ulteriore meccanismo di resistenza identificato nei ceppi analizzati è stato rappresentato dalla presenza del gene *bla*<sub>VIM</sub>, riscontrato nel 33,3% degli isolati. Ciò suggerisce il possibile incremento della produzione delle M $\beta$ L, finora riscontrate sporadicamente in questo batterio

(Zhao S et al., 2015). Tutti i ceppi *bla*<sub>VIM</sub>-positivi hanno presentato un profilo di resistenza simile, ad eccezione di due isolati (AC3 e AC39). In tutti i casi, gli isolati sono risultati resistenti ai carbapenemi, suggerendo il contributo della produzione di tale carbapenemasi come un ulteriore meccanismo di resistenza. Di fatto, la simultanea presenza di geni codificanti per le M $\beta$ L è stata segnalata in diverse parti del mondo (Peleg A et al., 2008; Amudhan SM et al., 2011). In Italia, è stata già documentata la presenza di ceppi di *A. baumannii bla*<sub>VIM</sub>-positivi. Nel 2011, è stata riportata per la prima volta un *outbreak* di casi di ulcera da decubito causate da *A. baumannii* produttori di M $\beta$ L verificatesi in una unità di terapia intensiva di un ospedale di Palermo e in un caso è stata riscontrata la presenza di un ceppo produttore di VIM-4 (Mammina C et al., 2011). Anche se a livello nazionale la presenza di questa carbapenemasi in *A. baumannii* non viene riportata frequentemente, la presenza di *bla*<sub>VIM</sub> in questo microrganismo è stata segnalata in numerose altre parti del mondo, come Iran (Davoodi S et al., 2015), India (Amudhan MS et al., 2012), Arabia Saudita (Al-Sultan A et al., 2015), Corea (Lee K et al., 2003) e in diversi Paesi europei (Polonia, Grecia, Germania) (Toleman M et al., 2004; Tsakris A et al., 2006; Wroblewska M et al., 2007). Inoltre, la prevalenza di tale M $\beta$ L in 69 ceppi di *A. baumannii* si è attestata al 14,5% secondo uno studio condotto in Turchia (Asgin N et al., 2019).

Nel presente lavoro di tesi, è stata anche valutata la presenza di altre carbapenemasi di classe B, quali IMP, GIM e NDM, ma non sono state riscontrate. L'assenza di tali carbapenemasi è in accordo con diversi studi che riportano VIM come la M $\beta$ L più frequentemente riscontrata in ceppi di *A. baumannii* (Amudhan SM et al., 2011; Mammina C et al., 2011; Zhao S et al., 2015), sebbene la sua produzione, insieme a quella di IMP, sia maggiormente osservata in *P. aeruginosa* (Ghamgosha M et al., 2015). I risultati dello studio, inoltre, concordano con i dati epidemiologici disponibili a livello globale, che riportano la circolazione di ceppi di *A. baumannii* produttori della carbapenemasi GIM in Germania (Queenan AM et al., 2007), Egitto (Alkasaby NM et al., 2017) e Arabia Saudita (Safari M et al., 2015) e di NDM in Brasile

(Pillonetto M et al., 2014), Cina (Chen Y et al. 2011), Egitto (Kaase M et al., 2011) ed India (Karthikeyan K et al., 2010). Ciononostante, ceppi di *A. baumannii* produttori di NDM sono stati anche segnalati in Francia e Grecia negli ultimi anni (Decousser JW et al. 2013; Voulgari E et al. 2016).

Sebbene le M $\beta$ L siano identificate con minore frequenza in *A. baumannii* rispetto alle carbapenemasi OXA, la loro attività idrolitica nei confronti dei carbapenemi è significativamente più elevata, essendo in grado di idrolizzare tutti gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, ad eccezione dei monobattami (aztreonam) (Amudhan SM et al., 2011).

Nei ceppi esaminati sono risultate assenti anche le carbapenemasi KPC e GES appartenenti alla classe A, in accordo con i dati disponibili in Italia (Nordmann P et al., 2009; Arnold RS et al., 2011; Ripabelli G. et al., 2018). Infatti, le  $\beta$ -lattamasi di tipo KPC si trovano prevalentemente e, a livelli endemici, in ceppi di *K. pneumoniae* (Nordmann P et al., 2009; Arnold RS et al., 2011; Ripabelli G et al., 2018) e in alcune specie di *Enterobacter* (Hossain A et al., 2004; Bratu S et al., 2005; Queenan AM et al., 2007). Gli unici casi di ceppi di *A. baumannii* produttori di KPC sono stati riscontrati a Porto Rico (Martinez T et al., 2016; Alkasaby NM et al., 2017).

Le carbapenemasi GES, sebbene rare, sono state identificate in tutto il mondo, inclusa l'Europa e, fatta eccezione per qualche focolaio di dimensioni limitate, sono state associate frequentemente a isolamenti sporadici o occasionali (Queenan AM et al., 2007).

Tra gli obiettivi del lavoro di tesi, vi era anche la valutazione della prevalenza di geni codificanti per le principali pompe di efflusso in *A. baumannii*, sebbene la determinazione dei rispettivi livelli di espressione avrebbe fornito un quadro più chiaro sul loro coinvolgimento nei meccanismi di resistenza agli antibiotici (Coyne S et al., 2010; Rosenfeld N et al., 2012). La resistenza mediata dalle pompe di efflusso, in particolare della famiglia 'Resistance Nodulation Division' (RND) ampiamente distribuite in *A. baumannii*, contribuisce significativamente a ridurre la suscettibilità a più antibiotici quando sono sovra-esprese (Coyne S et al., 2010). I geni appartenenti a tale famiglia, quali *adeB*, *adeG* e *adeJ*, sono stati riscontrati in tutti i ceppi

esaminati, confermando l'ampia distribuzione in tale batterio e suggerendo una potenziale associazione con la resistenza agli antibiotici (Lin MF, Lan CY, 2014). Anche il regolatore negativo dell'espressione delle pompe di efflusso, *soxR*, è stato riscontrato in tutti i ceppi, ma dal momento che è stata valutata la sola presenza è difficile valutarne l'effetto sui geni regolati da esso. È stato riportato che *soxR* è in grado di regolare direttamente codificanti per le pompe di efflusso. Infatti, la loro espressione, in particolare di *adeG* e *adeJ* appartenenti alla famiglia RND è risultata significativamente diminuita in presenza di una sovra-espressione di *soxR* (Li H et al., 2017).

Riguardo i geni codificanti per le altre pompe di efflusso, solo *abeS*, appartenente alla famiglia 'Small Multidrug Resistance' (SMR), è stato riscontrato in tutti i ceppi esaminati, mentre i geni *abeM* (famiglia 'Multidrug and toxic compound extrusion' - MATE) e *craA* (famiglia Major Facilities Superfamily - MFS) sono risultati sempre assenti, suggerendo un impatto poco significativo di tali sistemi nella resistenza conferita a cloramfenicolo, imipenem e fluorochinoloni. Al contrario, è importante sottolineare il ruolo di *abeS* nella resistenza verso alcuni antibiotici in *A. baumannii*, tra cui amikacina, cloramfenicolo e ciprofloxacina, come dimostrato in un altro studio (Srinivasan VB et al., 2009). Pertanto, la combinazione dei geni di resistenza e delle pompe di efflusso può rappresentare una strategia di successo per questo microrganismo nella sopravvivenza e nell'adattamento nell'ambiente ospedaliero (Jia W et al., 2015).

L'analisi mediante PFGE, utilizzando i due enzimi di restrizione *ApaI* e *AscI*, ha indicato la presenza di distinti cluster e pulsotipi. Di fatto, il principale obiettivo della genotipizzazione è quello di determinare se gli isolati siano correlati e, quindi, appartenenti ad un focolaio epidemico (Sammarco ML et al., 2014), poiché è noto che all'interno di popolazioni batteriche della stessa specie esiste un'ampia varietà genetica costituita da una o più sottopopolazioni geneticamente uniformi, denominate 'cloni', che provengono dallo stesso ceppo (Singh A et al., 2006; Sammarco ML et al., 2014). Proprio per la sua capacità discriminante, ad oggi, la

PFGE risulta essere uno dei metodi di scelta per la tipizzazione molecolare dei batteri, discriminando i ceppi in base alla loro “impronta digitale” (*fingerprint*) generata dalla digestione del genoma con un enzima di restrizione, che riconosce specifiche sequenze di DNA (Fontana C et al., 2013).

L’analisi del dendrogramma ottenuto attraverso la digestione con *ApaI* ha evidenziato una più elevata similarità tra i ceppi rispetto a quello ottenuto con *AscI*, generando infatti 4 cluster e 7 pulsotipi in confronto a 7 cluster e 11 pulsotipi rispettivamente, indicando un potere discriminante della metodica più elevato con l’impiego di *AscI* e suggerendo il suo utilizzo per i confronti inter-laboratorio (Chang KM et al., 2013).

Sebbene con l’enzima *AscI* sia stata evidenziata una maggiore capacità discriminante, la combinazione dei frammenti ottenuti dalla digestione con entrambi gli enzimi ha generato un dendrogramma sovrapponibile a quello ottenuto con *ApaI*. L’analisi combinata con i due enzimi ha consentito di osservare una maggiore prevalenza di un pulsotipo (PT4), suggerendo la circolazione nell’ambiente ospedaliero di ceppi altamente correlati tra loro, come riportato in altri studi (Da Silva GJ et al., 2016; Nowak P et al., 2016). Ciò è sostenuto dal fatto che tutti i ceppi caratterizzati dallo stesso pulsotipo hanno anche mostrato lo stesso profilo di resistenza per tutti gli antibiotici, compresi i due carbapenemi. Inoltre, tali ceppi sono risultati anche sensibili alla colistina, confermando l’elevata suscettibilità di ceppi MDR di *A. baumannii* verso questo antibiotico (Mezzatesta ML et al., 2008; Mammina C et al., 2011). Tuttavia, con l’aumentato ricorso alla colistina per il trattamento delle ICA causate da *A. baumannii*, si ritiene altamente probabile che anche la resistenza a tale antibiotico possa aumentare drasticamente, limitando ulteriormente le opzioni terapeutiche (Qureshi ZA et al., 2015).

Lo schema Oxford utilizzato per la tipizzazione di *A. baumannii* mediante MLST (Bartual S et al., 2005) ha evidenziato tre ST circolanti all’interno del Presidio Ospedaliero, con la maggiore prevalenza di ST1720, seguito da ST218 e ST513 e un ST non definito. I tre ST definiti rappresentano ognuno la variante monoallelica degli altri, differendo per il solo allele del gene

*recA*. Il nuovo ST, invece, è la variante monoallelica di ST1720 per il gene *rpoD*. I ceppi identificati e stratificati in base al ST non sono risultati altrettanto distinguibili con la PFGE, che li ha raggruppati negli stessi cluster o pulsotipi nonostante la variazione allelica. Questo può considerarsi plausibile, in quanto gli enzimi di restrizione utilizzati nella tecnica della PFGE riconoscono siti di taglio che evidentemente non hanno coinvolto i geni *housekeeping*, pur risultando variati con l'MLST. In ogni caso, tutti i ceppi in studio sono risultati altamente correlati.

Allo stato attuale, ancora pochi sono gli studi disponibili a livello europeo e nazionale riguardo i cloni maggiormente circolanti. Per *A. baumannii*, i vantaggi di una classificazione tramite MLST sono stati in qualche modo ridotti dalla coesistenza di due schemi, entrambi ampiamente utilizzati (Gaiarsa S et al., 2019). Gli schemi comprendono le specie *A. baumannii* e *Acinetobacter non-baumannii*. Il primo schema è stato indicato come schema di Oxford (Bartual S et al., 2005), mentre successivamente è stato introdotto un ulteriore approccio, conosciuto come schema Pasteur (Diancourt L et al., 2010). I due schemi sono risultati essere complementari, ma il sistema MLST-Oxford ha dimostrato di possedere un potere discriminante più elevato rispetto allo schema Pasteur (Tomaschek F et al., 2016) e per tali motivazioni, è stato utilizzato per questo studio.

Dati recenti relativi alla situazione epidemiologica in Italia, hanno evidenziato mediante lo schema MLST-Oxford la sola circolazione di ST415 in 13 ceppi di *A. baumannii* isolati in un *outbreak* ospedaliero in terapia intensiva (Venditti C et al., 2019). In un altro studio (Lorenzin G et al., 2019), sebbene condotto con l'altro schema (Pasteur), in ceppi isolati in un ospedale del nord Italia è stata, invece, riportata la circolazione di differenti ST, quali ST2, ST19, ST195, ST577 e ST632. I dati ottenuti sono stati confrontati anche con altri studi condotti in Egitto e India, che hanno utilizzato lo schema Oxford, in cui comunque sono stati identificati ST differenti rispetto a quelli osservati nel presente lavoro (Vijayakumar S et al., 2018; Al-Hassan L et al., 2019).

### **6.3. Determinanti di resistenza agli antibiotici in *S. enterica* non tifoidea in campioni di diversa matrice**

*Salmonella* è l'agente batterico più comunemente isolato in caso di infezioni trasmesse da alimenti. Le infezioni da *Salmonella* spp. possono verificarsi nell'uomo e negli animali domestici, da cortile e selvatici, compresi i rettili domestici (iguane e tartarughe d'acqua). I principali serbatoi sono rappresentati proprio dagli animali e dai loro derivati (carne, uova e latte consumati crudi o non pastorizzati) e dall'ambiente (acque non potabili) (Epicentro.iss.it.). In Italia, il numero dei casi di *Salmonella* spp. isolati da casi umani nel 2018, forniti dalla rete di sorveglianza Enter-Net, è stato di 3656, evidenziando un lieve incremento rispetto agli anni precedenti (EFSA e ECDC, 2018). Nel 2018, gli Stati Membri dell'UE hanno segnalato 5146 focolai epidemici di origine alimentare mista che hanno colpito 48365 persone; rispetto al 2017, è stato riscontrato un leggero aumento nel numero di persone coinvolte (+2897), nelle ospedalizzazioni (4588 ricoverati, +1%) e nei decessi (40 decessi, +21%). Il 13% dei focolai si è verificato in ambito familiare e *Salmonella* è stato il principale agente causale anche nel 2018, responsabile di 1 focolaio su 3 (Epicentro.iss.it.).

Slovacchia, Spagna e Polonia hanno registrato il 67% dei 1581 focolai totali dovuti a *Salmonella*. Come negli anni precedenti, la maggior parte dei focolai sono stati causati dal serovar *S. Enteritidis*, che sono aumentati del 36,3% rispetto al 2017 (European Food Safety Authority, 2019). Gli eventi epidemici causati da *Salmonella* e *S. Enteritidis* nel 2018 sono stati principalmente associati a uova e prodotti a base di uova, come negli anni precedenti (European Food Safety Authority, 2019).

Una parte di questo lavoro di tesi ha riguardato lo studio di ceppi di *S. enterica* non tifoidea isolata da campioni di varia matrice (alimenti-, ambienti e acqua), presso il Public Health England (PHE), sezione Food Water and Environmental e Gastrointestinal Bacteria Reference



Unit di Colindale, Londra. In particolare, l'analisi ha riguardato un dataset di 74.958 campioni di diversa origine, includendo alimenti, mangimi, campioni ambientali e acqua, prelevati nell'ambito della sorveglianza igienico-sanitaria effettuata nel Regno Unito. È stata successivamente identificata la categoria maggiormente coinvolta nella contaminazione da parte di *Salmonella*. I risultati sono stati interessanti, poiché i campioni maggiormente coinvolti, in termini di prevalenza in ogni matrice, sono risultati quelli ambientali e isolati da acqua (2,5% e 9,8% rispettivamente). I campionamenti hanno riguardato *swab* su superfici deputate alla preparazione di alimenti o che potrebbero essere coinvolte in contaminazioni crociate durante la preparazione degli stessi, come maniglie, rubinetti, porte, oppure campioni di panni usati per la pulizia o l'asciugatura delle mani. I campioni di acqua, come i campioni ambientali, sono stati prelevati soprattutto da cucine di ristoranti, in taniche oppure nei lavandini dove erano stati posti molluschi e frutti di mare. È necessario sottolineare che questi campionamenti non sono stati casuali, in quanto avvenuti a seguito di segnalazioni di *outbreak* correlati al consumo di alimenti nei ristoranti. Ciò sicuramente può aver determinato una sovrastima dei casi positivi sul totale.

Inoltre, il 2% dei campioni di mangime per animali, soprattutto *dental-stick* per cani, è risultato positivo. La prevalenza di *Salmonella* non tifoidea in campioni di *pet-food* è risultata piuttosto alta. La sicurezza alimentare e microbiologica degli alimenti per animali, soprattutto quelli domestici, è importante per la salute e la sicurezza nell'ambiente domestico, poiché ceppi di *Salmonella* possono diffondersi nell'ambiente attraverso alimenti per animali, che spesso non vengono manipolati in maniera sicura, implicando un elevato rischio di contaminazione crociata e, quindi, un elevato rischio per la salute umana. Pertanto, è necessario implementare gli studi epidemiologici a riguardo, al fine di valutare le strategie per aumentare la consapevolezza del rischio da parte dei proprietari di animali domestici (Finley R et al., 2006). Tra i 982/74.598 campioni positivi a *Salmonella*, l'85% è risultato proveniente da matrici alimentari destinate al consumo umano, dei quali il 46% appartenenti alla categoria di tipo RTE.

L'alto tasso di *Salmonella* negli alimenti RTE è preoccupante e rappresenta un rischio importante per la salute pubblica (McLauchlin J et al., 2019). Questo tipo di alimenti non richiede alcun processo prima del consumo. Pertanto, risulta indispensabile migliorare le pratiche di igiene nel processo di produzione alimentare, rafforzando ulteriormente la sorveglianza dei prodotti alimentari per evitare la contaminazione dei prodotti RTE. L'elevata prevalenza di *Salmonella* indica inadeguate condizioni igienico-sanitarie durante la lavorazione, nonché nell'ambiente e una scarsa igiene degli addetti durante la preparazione dei prodotti (Beshiru A et al., 2019). Anche le foglie edibili hanno rappresentato una categoria di alimenti risultati spesso contaminata (26,9%) da *Salmonella* non tifoidea. Le foglie di *betel*, conosciute anche come foglie di *paan*, sono un alimento tradizionale RTE che le popolazioni del Sud-Est Asiatico combina con vari ripieni e mastica dopo i pasti come un leggero stimolante della digestione e rinfrescante dell'alito (McLauchlin J et al., 2019). Il consumo di tali prodotti è stato, tuttavia, associato a carcinoma orale (Gupta B e Johnson N, 2014) e presenta anche rischi di natura microbiologica. La contaminazione da *Salmonella* è stata già precedentemente segnalata in India e Bangladesh (Singh A et al., 2006; Fakruddin M et al., 2017; Haque MM et al., 2017; Nahar N et al., 2018). Inoltre, il consumo di questi alimenti è stato già collegato a febbre tifoide in India e Cambogia (Singh A et al., 2006; Singh PN et al., 2012). I rischi per la salute pubblica associati al consumo di alimenti di origine non animale stanno diventando sempre più evidenti (EFSA, 2013) e tra tutti gli alimenti esaminati dal PHE tra il 2011 e il 2017, le foglie di *betel* sono stati gli alimenti RTE più comunemente contaminati da *Salmonella* (McLauchlin J et al., 2018). A seguito di questa osservazione, il campionamento e il test delle foglie di *betel* sono stati incorporati nel programma nazionale di monitoraggio degli alimenti importati nel Regno Unito. Inoltre, il PHE ha implementato il monitoraggio di questi alimenti con campionamenti aggiuntivi nell'ambito dei controlli ufficiali come previsto dalla legislazione dell'UE (Regolamento (CE) n. 669/2009 dell'UE; Willis C et al., 2015; McLauchlin J et al., 2018). Non sono ben noti i meccanismi di contaminazione che potrebbero verificarsi

nei Paesi di origine durante la coltivazione, in particolare, a causa dell'utilizzo di acqua contaminata o dopo la raccolta o in qualsiasi altro punto della catena alimentare. Singh BR et al. (2006) hanno riportato la presenza di *Salmonella* nell'acqua utilizzata nella vendita al dettaglio per inzuppare le foglie di *betel* in India. Fakruddin M et al. (2017) hanno riportato la possibilità che *Salmonella* possa migrare all'interno del tessuto fogliare del *betel*. Pertanto, è improbabile che i trattamenti di lavaggio (compresa la sanificazione) rimuovano tutta la carica batterica e gli eventuali patogeni da questi prodotti e, poiché essi sono spesso venduti sfusi negli esercizi commerciali, esiste un elevato rischio di contaminazione crociata dalle foglie di *betel* ad altri prodotti venduti al dettaglio (McLauchlin J et al., 2018). Ad oggi, sono in atto restrizioni poste dall'Unione Europea riguardo l'importazione e il consumo di tale alimento. È stata, infatti, attuata una sospensione dell'importazione di tale alimento dal Bangladesh, strategia che però sembra non aver sortito particolare effetto in quanto le foglie continuano ad essere importate e vendute nel Regno Unito.

Tra i campioni positivi a *Salmonella* non tifoidea è stato registrato un picco nel 2017; ciò è stato verosimilmente dovuto a campioni contaminati di pollo congelato importati dal Brasile e a campioni di origine ambientale prelevati nell'ambito di indagini su focolai epidemici dovuti a *S. Typhimurium* (Mair-Jenkins J et al., 2017). Il Regno Unito importa una considerevole quantità di pollo dal Brasile, la maggior parte del quale risulta essere contaminata da *S. Heidelberg*. Come altri cibi crudi, il pollo, viene venduto come alimento da sottoporre a cottura, che permetterebbe di eliminare la carica batterica e rendere il cibo commestibile e "sicuro", ma può essere fonte di contaminazione crociata, che potrebbe interessare altri cibi e l'ambiente di preparazione del pasto.

La crescente evoluzione degli isolati di *Salmonella* non tifoidea resistenti a più antimicrobici è un problema fuori controllo per questo batterio che, già dagli anni '90, negli isolati clinici, ha mostrato una frequente resistenza ad antimicrobici convenzionali come ampicillina, cloramfenicolo o sulfamidici (Florez-Cuadrado D et al., 2018). Gli isolati clinici di *Salmonella*

mostrano ad oggi alti tassi di resistenza a sulfamidici, tetracicline e ampicillina e la produzione di ESBL è stata identificata nello 0,5% degli isolati di origine umana nell'UE, con oltre 10 diversi *serovars* rappresentati (EFSA, 2017).

Nel presente lavoro di tesi, *S. Heidelberg* è risultato prevalente (61%) e ha mostrato elevate percentuali di multiresistenza, rappresentando un grave problema per la salute pubblica (Tibac-Casas MR et al., 2018). Questo *serovar* ha la capacità di infettare più specie ospiti, anche se storicamente è associato a pollo ed è tra i primi cinque serovar di *Salmonella* più comunemente associati alle infezioni umane (Foley S, 2013, Shah DH et al., 2017). Per quanto riguarda i dati di multiresistenza nell'UE, i tassi più elevati corrispondono a *S. Typhimurium* monofasica, attualmente il terzo *serovar* più frequente che causa infezione nell'uomo in Europa, con 5770 casi registrati nel 2015, oltre ad essere il secondo più rappresentato nei suini e il primo in termini di multiresistenza. *S. Heidelberg* è diventato clinicamente significativo a causa dell'aumento della prevalenza di ceppi MDR e della resistenza alle cefalosporine di terza generazione (Shah DH et al., 2017). Spesso, *S. Heidelberg* è caratterizzato dalla presenza di plasmidi, che conferiscono particolare virulenza o resistenza a disinfettanti e metalli pesanti, fornendo un vantaggio selettivo per la sopravvivenza nell'ambiente della produzione di polli da carne in cui vengono utilizzate strategie di controllo dei patogeni (Foley S, 2013). È importante porre l'attenzione al fatto che questa tipologia di alimento è ampiamente esportata dal Brasile e trasportata in tutto il mondo, causando una notevole disseminazione a livello globale dei determinanti di resistenza.

Nel presente studio, l'analisi di dati WGS ha rivelato in ceppi di *S. Heidelberg* una significativa eterogeneità genetica, indicando una notevole plasticità genomica all'interno di questo sierotipo (Suez J et al., 2013; Dhanani A et al., 2015). Questa può facilitare l'acquisizione di nuovi determinanti genetici, tra cui i geni di resistenza che, unitamente alla capacità di questo *serovar* di causare gravi infezioni invasive, potrebbe potenzialmente limitare le opzioni di trattamento nei casi clinici (Suez J et al., 2013; Dhanani A et al., 2015). Pertanto, sono necessarie ulteriori

ricerche al fine di monitorare e tracciare *S. Heidelberg* MDR, per determinare i fattori genetici che possono conferire una maggiore invasività al *serovar* nell'uomo e per identificare i tratti genetici che conferiscono vantaggi di nicchia e/o espansione clonale nel pollame.

Lo studio ha successivamente riguardato un sottoinsieme di dati relativi a 384 isolati di *Salmonella enterica* non tifoidea provenienti da Regno Unito, Thailandia e Brasile. A tal proposito, si è voluto effettuare un confronto di dati relativi a tre regioni geografiche lontane tra loro, con legislazioni differenti in merito all'utilizzo di antibiotici e che, al contempo, presentavano completezza e omogeneità di dati WGS sufficienti al confronto. In questo sottoinsieme di dati, i *serovar* erano stati isolati soprattutto da campioni di *pet-food* e di foglie dalla Thailandia, da campioni di pollo soprattutto dal Brasile e da quelli di origine ambientale raccolti a seguito di monitoraggi ambientali condotti nel Regno Unito. La diversità genetica, in termini di differenti *serovar* e profili di resistenza, ha riguardato maggiormente i campioni provenienti dalla Thailandia rispetto a quelli provenienti dal Brasile e dal Regno Unito. Questo potrebbe essere dovuto alla notevole diversità in termini di cibo importato e soprattutto riguardo alle politiche poco stringenti nell'utilizzo di antibiotici, sia a livello comunitario, sia nell'allevamento e in agricoltura, che permetterebbe la selezione e la diffusione di diversi ceppi MDR. L'Asia e, quindi, anche la Thailandia è caratterizzata da un elevato utilizzo di antibiotici auto-prescritti, a causa della mancanza di servizi sanitari qualificati e sostenibili economicamente e dalla mancanza di conoscenza che un inappropriato utilizzo degli antibiotici può determinare resistenza agli antimicrobici (Nepal G et al., 2018). Inoltre, l'elevata crescita in termini di popolazione che caratterizza queste Regioni causa una notevole richiesta di cibo, soprattutto di carne, che viene soddisfatta grazie ad allevamenti intensivi che richiedono, a loro volta, un ingente uso di antibiotici per garantire la salute degli animali allevati (soprattutto di pollame). Tutto ciò si traduce nell'aumento dell'antibiotico-resistenza. Tuttavia, la Thailandia ha aperto la strada all'applicazione di regolamenti più severi sull'uso di antimicrobici nel

bestiame con misure che includono un divieto, fin dal 2015, di utilizzare gli antimicrobici a dosi sub-terapeutiche per la promozione della crescita (Coyne L et al., 2019).

L'analisi dei 384 campioni positivi a *Salmonella* non tifoidea proveniente da Regno Unito, Thailandia e Brasile ha evidenziato un'elevata prevalenza (86,5%) di ceppi MDR, dei quali il 75% proveniva da pollame del Brasile. Infatti, i ceppi con questa provenienza hanno mostrato un livello di resistenza verso  $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, chinoloni, sulfametossazolo e tetracicline variabile dal 75% al 100%. Questo sicuramente è dovuto ad un eccessivo uso di antimicrobici nell'allevamento dei polli, poiché il Brasile presenta un clima sub-tropicale, con temperature piuttosto alte, richiedendo l'uso di antibiotici negli allevamenti intensivi (Bokma-Bakker M et al., 2014). Uno studio recente (Bokma-Bakker M et al., 2014) ha riportato che non erano disponibili informazioni sulle quantità usate/vendute di antibiotici ad uso veterinario in Brasile e che è stato proposto di monitorare l'uso di antibiotici (quantità usate/vendute) e di estendere i monitoraggi da 17 a 140 sostanze antimicrobiche, ma sarebbero necessari da cinque a dieci anni per stabilire adeguati sistemi di monitoraggio. Ad oggi, in Brasile, non esistono regolamenti, né linee guida governative per la classificazione degli antibiotici come prima, seconda o terza scelta per uso veterinario al fine di preservarne l'utilizzo nell'uomo (Roth N et al., 2019). In Brasile, l'uso umano di antibiotici è stato gratuito fino al 2012; da allora, è disponibile solo su prescrizione medica e l'uso di antibiotici come promotori della crescita è ancora consentito (Roth N et al., 2019), contribuendo significativamente all'emergenza di ceppi MDR.

I campioni provenienti dal Regno Unito hanno presentato, invece, un livello di resistenza antimicrobica più basso, rispetto ai ceppi provenienti da Brasile e Thailandia; ciò è certamente dovuto a regole più stringenti nell'utilizzo degli antimicrobici nell'UE. Infatti, sin dal 2006, in Europa, l'utilizzo di antibiotici come promotori della crescita in animali da allevamento è stato messo al bando.

La  $\beta$ -lattamasi più diffusa è stata CMY-2 presente nel 75% dei campioni del Brasile, che codifica per la resistenza alle cefalosporine ed è spesso riscontrata negli isolati di *S. Heidelberg* provenienti dal Brasile resistenti al ceftriaxone (Peirano G et al., 2006). È considerata la  $\beta$ -lattamasi più diffusa nei ceppi di *Salmonella* soprattutto se provenienti dalle Regioni Americane ed è tipica di polli e carne di pollo (Campos J, 2018). Inoltre, essa conferisce una notevole virulenza, che può portare ad un aumento della mortalità in caso di infezione (Moura Q et al., 2017). Tale  $\beta$ -lattamasi è stata evidenziata anche in uno studio condotto nei Paesi Bassi, che ne ha riportato la presenza sempre in ceppi di *S. Heidelberg* isolati da carne di pollame importata dal Brasile (Liakopoulos A et al., 2016), perfettamente in linea con i dati ottenuti nel presente studio. Al contrario, essa è risultata assente negli isolati da Thailandia e Regno Unito che hanno presentato, invece, come  $\beta$ -lattamasi prevalente TEM-1 nel 10% dei ceppi. TEM-1 è risultata la ESBL prevalente (93,3%) in 178 ceppi di *Salmonella* non tifoidea isolati in Cina nel periodo 2007-2016 (Zhan Z et al., 2019).

Il geni *aac(6')*Iy, codificante per aminoglicoside-acetiltransferasi implicata nell'acquisizione di resistenza alla gentamicina (Cohen E et al., 2019), è risultato prevalente nei ceppi da Brasile (100%), Thailandia (56%) e Regno Unito (70%), che hanno anche presentato, nel 37% dei casi, la variante *aac(6')*-Iaa . In altri studi, la variante *aac(6')*-Iy è stata riconducibile soprattutto al serovar Enteritidis, *aac(6')*-Iaa al serovar Typhimurium e Kentucky (Neuert S et al., 2018). Nel presente studio, invece, la presenza di *aac(6')*-Iy ha riguardato tutti i ceppi di *serovar Heidelberg*, invece la variante *aac(6')*-Iaa non è stata associata ai *serovar Typhimurium* e Kentucky, poiché Kentucky è risultato completamente assente e Typhimurium ha presentato una bassa prevalenza, in disaccordo con i dati riportati in letteratura. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato dall'elevata mobilità dei determinanti di resistenza intra-specie, da *serovar a serovar*, e inter-specie.

Le varianti di *parC* e *gyrA*, che mediano la resistenza ai fluorochinoloni come la ciprofloxacina (Acheampong G et al., 2019), hanno interessato la quasi totalità dei ceppi dal Brasile (97% e

85%, rispettivamente), mentre in ceppi provenienti da Tailandia è stata osservata una prevalenza del 59% in *parC* e del 31% in *gyrA*. Nei ceppi dal Regno Unito, le varianti di *parC* sono state riscontrate nel 70% e solo nel 12% in *gyrA*. In accordo con dati di letteratura, la resistenza ai chinoloni è molto diffusa nei ceppi di *Salmonella* spp. isolati da alimenti in Brasile (Pribul B et al., 2017). Tali antibiotici sono comunemente usati per il trattamento della salmonellosi da ceppi MDR in medicina umana e veterinaria per la loro attività antimicrobica ad ampio spettro, ma l'aumento della resistenza costituisce un'ulteriore difficoltà nel controllo di tali infezioni (Pribul B et al., 2017). I geni *sul-2*, associato alla resistenza al sulfametossazolo, e *tetA*, coinvolto nella resistenza alla tetraciclina, sono risultati i determinanti di resistenza prevalenti (rispettivamente 94,2% e 94,6%) nei ceppi di *Salmonella*, specialmente in quelli provenienti dal Brasile. Al contrario, i ceppi provenienti dalla Tailandia hanno mostrato una bassa prevalenza di questi geni, come quelli dal Regno Unito. I geni *sul-2* e *tetA* sono riportati tra i determinanti di resistenza prevalenti nelle rispettive classi antibiotiche (sulfamidici e tetracicline) anche in un recente studio (Neuert S et al., 2018), essendo risultati presenti in 490/927 (*sul2*) e in 843/927 (*tetA*) ceppi testati, rispettivamente. L'elevata prevalenza di questi determinanti nei ceppi provenienti dal Brasile rispetto a quelli da Tailandia e Regno Unito sottolinea l'assenza di politiche di *stewardship* antimicrobica in questa Nazione del Sud America, che può rappresentare una importante concausa della selezione e diffusione di resistenze batteriche. L'elevata resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati da campioni di pollo, importati nel Regno Unito dal Brasile, rispetto agli altri coinvolti nello studio, sottolineano la dimensione del problema. Il Brasile è il terzo maggiore produttore di carne di pollo dopo Stati Uniti e Cina) ed è il maggiore esportatore di questo prodotto (U.S. International Trade Commission, 2012). Le politiche sanitarie e le scelte operate in tale Paese dovrebbero essere maggiormente orientate a definire normative e procedure necessarie per mitigare il problema dell'AMR, superando l'inadeguatezza e talvolta l'assenza di leggi nazionali e di linee guida sull'adeguato utilizzo di antibiotici.



## 7. Conclusioni

L'emergenza di un numero sempre più crescente di batteri patogeni resistenti agli antibiotici costituisce una minaccia allarmante per la salute pubblica, in particolare per i gruppi più vulnerabili della popolazione, come persone immunodepresse, anziani e bambini (Alsan M et al., 2018). Ciò rende l'antibiotico-resistenza un problema prioritario di sanità pubblica a livello mondiale. Le sue implicazioni non sono solo di carattere sanitario (aumento della morbilità, letalità, durata della malattia, sviluppo di complicanze, epidemie), ma anche di carattere economico poiché influisce sui costi per l'impiego di farmaci e procedure più costose e per il prolungamento dei tempi di degenza. La resistenza ai farmaci è determinata dalla presenza di geni codificanti per enzimi o proteine coinvolti nel metabolismo degli antibiotici. Si passa dalla presenza di enzimi che degradano l'antibiotico a geni che codificano per pompe di efflusso che espellono il farmaco dal comparto intracellulare del batterio, impedendo il raggiungimento delle concentrazioni utili all'attività della molecola, per finire a modificazione dei siti target dell'antibiotico stesso.

Il crescente utilizzo della genomica ha condotto alla revisione della definizione di microrganismi e a riconsiderare le capacità di un batterio mediante lo studio del metabolismo, della fisiologia, dell'ecologia e delle relazioni ospite-patogeno e, quindi, a riesaminare l'insieme di metodi e approcci utili a contrastare le infezioni (Nature Reviews Genetics, 2019). Le tecniche molecolari, che prevedono l'analisi del genoma, in breve tempo, permetterebbero di effettuare una sorta di "antibiogramma molecolare". Grazie al loro impiego, è possibile in un giorno, virtualmente senza alcuna necessità di coltivazione batterica, ottenere un profilo di resistenza genetica, che può essere la base per la decisione di una terapia mirata e rapida. Queste tecniche, inoltre, fornendo dati oggettivamente accurati e confrontabili a livello mondiale, consentono di implementare la sorveglianza dei ceppi batterici più virulenti e resistenti e di

implementare le strategie specifiche per contenere e contrastare il fenomeno (Nature Reviews Genetics, 2019).

In questo lavoro di tesi, sono stati utilizzati vari approcci genomici allo scopo di valutare le dimensioni dell'antibiotico-resistenza e i suoi determinanti, analizzando ceppi di *K. pneumoniae* e *A. baumannii* implicati nell'insorgenza di infezioni correlate all'assistenza e ceppi di *Salmonella enterica* non tifoidea, agente eziologico della maggior parte di malattie a trasmissione alimentare. In particolare, per l'analisi di ceppi MDR di *K. pneumoniae* e *A. baumannii* isolati nel *setting* ospedaliero della Regione Molise, sono state impiegate diverse metodiche, quali PFGE, usata per la tipizzazione molecolare degli isolati e la valutazione delle relazioni clonali esistenti tra essi; MLST ai fini di un'ulteriore genotipizzazione e di un confronto sui cloni circolanti con i dati disponibili a livello nazionale e internazionale; PCR, al fine di determinare la prevalenza di determinanti genici alla base dell'antibiotico-resistenza; il sequenziamento con metodo Sanger per l'identificazione di mutazioni all'interno di geni coinvolti nell'acquisizione di resistenza antibiotica (genomica di vecchia generazione). Nello studio di ceppi di *S. enterica* non tifoidea isolati da diverse matrici sono stati analizzati dati ottenuti mediante WGS, tecnica che prevede il sequenziamento dell'intero genoma batterico da cui è possibile estrapolare ogni informazione, includendo l'appartenenza a complessi clonali e la presenza di determinanti di resistenza acquisita da plasmidi oppure dovuta all'insorgenza di mutazioni in geni coinvolti in tali meccanismi (genomica di nuova generazione).

L'utilizzo di metodiche molecolari è, quindi, necessaria non solo per confermare i dati ottenuti mediante metodi fenotipici tradizionali (antibiogramma, sierotipizzazione, prove biochimiche, ecc.), ma è anche essenziale per definire il fenomeno in modo esaustivo e per fornire una visione più ampia della diffusione e dell'evoluzione tramite la determinazione dei profili genetici associati alla resistenza agli antibiotici.

Il presente lavoro di tesi ha riguardato lo studio della resistenza ai carbapenemi e alla colistina negli isolati clinici di *K. pneumoniae* e di *A. baumannii* della Regione Molise. I risultati sono

di notevole utilità per una migliore comprensione dell'epidemiologia delle infezioni ospedaliere sostenute da tali microrganismi a livello locale e possono essere certamente validi per il confronto con i dati disponibili a livello nazionale e internazionale, completandone il quadro epidemiologico.

Lo studio di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi ha permesso di confermare che le infezioni/colonizzazioni sostenute da questo microrganismo sono, come atteso, più comunemente rilevate nei pazienti in terapia intensiva, a causa delle loro condizioni critiche e delle procedure invasive, e che l'enzima KPC, nel contesto esaminato, è la carbapenemasi predominante, seguita da VIM. Il lavoro svolto ha permesso di riscontrare un livello più elevato di resistenza alla colistina nei ceppi di *K. pneumoniae* rispetto a quello osservato in altri studi condotti in Italia, sebbene provenienti dal sistema di sorveglianza degli 'Alert organisms'. Grazie all'amplificazione e al successivo sequenziamento del gene *mgrB*, implicato nel mantenimento della suscettibilità alla colistina, è stato possibile associare la resistenza a tale antibiotico all'acquisizione di Sequenze di Inserzione o all'accumulo di mutazioni deleterie in esso, escludendo completamente la presenza delle varianti plasmidiche di tipo *mcr*. Ulteriori indagini sono comunque necessarie per chiarire l'intero ruolo del sistema di segnalazione Pmr nei ceppi resistenti alla colistina, soprattutto in relazione ad un ceppo che, pur risultando resistente ad esso, non ha mostrato mutazioni nel gene target. La tipizzazione molecolare di ceppi mediante PFGE ha permesso di identificare cluster sia per *K. pneumoniae*, sia per *A. baumannii*. Tale metodica, ormai relativamente economica rispetto ad altre tecniche molecolari, risulta comunque laboriosa poiché richiede diversi giorni per una sua corretta esecuzione. La metodica MLST, sebbene non abbia permesso di discriminare i cluster diversamente evidenziati tramite la PFGE, ha fornito una descrizione accurata dei cloni circolanti nel contesto ospedaliero regionale, consentendo di confrontarli con i dati nazionali e internazionali. È stato, infatti, possibile associare la presenza della carbapenemasi KPC, di cui sono stati confermati i livelli endemici, all'elevata prevalenza del clone ST512, variante monoallelica di ST258, che è il

primo clone associato alla diffusione della carbapenemasi KPC a livello globale. Inoltre, è stato possibile identificare una transizione in *K. pneumoniae* verso un aumento della circolazione di ST101, anch'esso oggi considerato particolarmente virulento e responsabile della diffusione di KPC. Le infezioni sostenute da ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi, in particolare quando producono KPC, sono ampiamente distribuite e i trattamenti antimicrobici dovrebbero essere valutati criticamente, determinando anche il profilo molecolare del ceppo in questione (Ripabelli G et al., 2018). Alla luce della mancanza di nuovi agenti antimicrobici per il trattamento delle infezioni correlate all'assistenza difficili da trattare, l'attuazione di adeguate strategie di prevenzione e un'adeguata disponibilità di personale formato è essenziale per controllare la diffusione di MDR *K. pneumoniae* (Ripabelli G et al., 2019).

Anche la caratterizzazione bio-molecolare di ceppi di *A. baumannii* isolati nel medesimo Presidio Ospedaliero fornisce per la prima volta dati riguardanti la situazione epidemiologica nella Regione Molise. Lo studio di questi isolati ha consentito di attribuire al gene *bla<sub>OXA-23</sub>* la resistenza ai carbapenemi e, parallelamente, ha anche confermato la drastica riduzione di *bla<sub>OXA-58</sub>*, in accordo con i dati italiani. Inoltre, la resistenza verso le oximino-cefalosporine è stata associata all'enzima AmpC e avvalorata dall'assenza delle ESBL. La ricerca dei determinanti genetici di resistenza mediante saggi specifici di PCR ha permesso di evidenziare l'emergenza della carbapenemasi VIM, evidenziata solo raramente in *A. baumannii*, il cui aumento anche nel contesto italiano potrebbe essere dovuta ad un aumento dei viaggi internazionali e intercontinentali, data la maggiore prevalenza nei Paesi dell'Est Europa e dell'Asia.

L'uso di WGS, che attraverso il sequenziamento dell'intero genoma di un batterio in sostanza include i risultati ottenibili attraverso tutte le tecniche di amplificazione e sequenziamento come PCR e MLST, ha consentito di analizzare rapidamente i dati relativi a quasi 75.000 ceppi di *S. enterica* non tifoidea a fini epidemiologici. Inoltre, è un metodo standard, i cui dati ottenuti possono essere confrontati in tutto il mondo basandosi sul risultato oggettivo della sequenza di

DNA. Tale tecnica ha mostrato un'ottima applicabilità anche per lo studio e la rilevazione di nuovi meccanismi di antibiotico-resistenza. Pertanto, WGS dovrebbe essere implementato su larga scala nello studio dell'AMR. Dal sequenziamento del genoma batterico completo alla metagenomica, offre un ampio set di strumenti in grado di identificare e caratterizzare rapidamente i ceppi microbici, fornendo informazioni ad alta risoluzione sul genoma e permettendo una comprensione accurata dei meccanismi genetici responsabili della resistenza ai farmaci (Hendriksen RS et al. 2019). La genomica dei microrganismi è alla base delle scienze omiche e include la trascrittomica, metagenomica, metatrascrittomica, garantendo il superamento degli approcci riduzionistici al fine ultimo di descrivere il corredo completo dei geni di un organismo e l'analisi della biodiversità (Hasin Y et al., 2017). Inoltre, fornisce supporto agli studi di trasferimento genico laterale (antibiotico-resistenza, metabolismo degli xenobiotici) e nella ricostruzione di vie metaboliche e della comprensione della biologia dei sistemi.

Il lavoro di tesi ha permesso di avvalorare che il WGS è un metodo efficace per lo screening di un gran numero di isolati e dei determinanti di resistenza, poiché i dati risultano accurati e meno soggetti a errori, quindi, particolarmente utili al confronto rispetto ai dati ottenuti con metodi tradizionali (Tang S et al., 2019). Il futuro utilizzo del WGS per la determinazione dei profili di resistenza richiede ulteriori studi, poiché il resistotipo rappresenta un carattere fenotipico dovuto all'interazione tra il genotipo e l'ambiente, sarà necessario stabilire il ruolo di diversi determinanti genici di resistenza antibiotica, presi sia singolarmente, sia in associazione, nella determinazione della MIC ad ogni antibiotico (Nair S et al., 2016). La generazione, quasi in tempo reale, di dati molecolari su molti ceppi contemporaneamente genera una risorsa significativa e una base di partenza per la ricerca e lo sviluppo di nuove tecniche e strategie. Nel dettaglio, è stato possibile valutare in un tempo relativamente breve quali determinanti di resistenza agli antibiotici, e loro varianti, fossero maggiormente diffusi nel contesto internazionale. La  $\beta$ -lattamasi più diffusa è risultata CMY-2 soprattutto in isolati provenienti

dal Brasile, risultata assente negli isolati da Thailandia e Regno Unito e che hanno presentato, invece, TEM-1. Il gene *aac(6')Iy*, codificanti per aminoglicoside-acetiltransferasi è risultato prevalente sia nei ceppi da Brasile, sia in quelli da Thailandia e Regno Unito. Mutazioni nei geni cromosomici *parC* e *gyrA*, che mediano la resistenza ai fluorochinoloni caratteristici della quasi totalità dei ceppi dal Brasile sono risultate mediamente presenti in quelli provenienti da Thailandia e dal Regno Unito. *sul-2*, e *tetA* anch'essi prevalenti nei ceppi provenienti dal Brasile, hanno mostrato una bassa prevalenza negli altri Paesi in studio.

È da segnalare che sono necessarie linee guida e procedure operative per raccogliere e integrare i dati di WGS con altre tecniche utilizzate nelle indagini epidemiologiche, al fine di garantire le strategie più appropriate per la tutela della salute pubblica. In linea di principio, la sequenza genomica di un microrganismo contiene tutte le informazioni ottenibili usando metodi di vecchia generazione (PFGE, PCR, sequenziamento di Sanger, MLST), ma WGS ha il potenziale di sostituire molte delle procedure ad alta intensità di lavoro ancora utilizzate (Gilchrist C et al., 2015). Nello studio, i dati molecolari sull'antibiotico-resistenza in ceppi di *Salmonella* non tifoidea hanno evidenziato caratteristiche importanti del fenomeno a livello globale. I ceppi provenienti dal Regno Unito hanno mostrato un livello di resistenza più basso, sia in termini di prevalenza dei ceppi MDR, sia di prevalenza dei determinanti genici associati ad essa. Gli isolati hanno mostrato, infatti, bassa resistenza ai  $\beta$ -lattamici, alle tetracicline e ai sulfamidici, nonché a macrolidi, amfenicoli e trimetoprim, ma è stata significativa la prevalenza dei geni coinvolti nella resistenza ad aminoglicosidi e chinoloni; inoltre, un ceppo ha presentato il determinante di resistenza per la fosfomicina. I ceppi provenienti dalla Thailandia hanno presentato un livello di resistenza intermedio, con elevata resistenza per chinoloni e aminoglicosidi, bassi livelli di resistenza verso  $\beta$ -lattamici, macrolidi, trimetoprim, sulfamidici e tetracicline, ma sono stati gli unici ceppi a presentare, anche se in basse percentuali, i determinanti di resistenza per amfenicoli. Inoltre, tali ceppi hanno mostrato un'ampia gamma di determinanti genici in termini di numero di varianti e di classi antibiotiche interessate. I ceppi

provenienti dal Brasile hanno presentato livelli di multiresistenza elevati, rappresentando circa il 75% dei ceppi MDR in studio. La quasi totalità dei ceppi ha mostrato determinanti di resistenza verso  $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, chinoloni, tetracicline e sulfamidici e bassi/nulli livelli di resistenza a macrolidi, amfenicoli e trimetropim. Dai dati di WGS, è stato evidente che il Regno Unito, come l'Europa, attua strategie contenitive per il contrasto del fenomeno dell'AMR, soprattutto per quanto riguarda la *stewardship* antimicrobica, con la messa al bando degli antibiotici utilizzati come promotori della crescita e linee guida per l'utilizzo consapevole nel comparto animale di tali molecole, al fine di tutelarne l'efficacia nell'uomo. La Thailandia sta cercando una strategia di controllo del fenomeno indirizzata verso la tutela di quelle classi di antibiotici per cui ancora non è emersa una resistenza elevata. Il Brasile, data l'assenza di sistemi di sorveglianza, nonché di linee guida e norme sull'argomento, non sta ancora partecipando attivamente alla lotta a questo fenomeno, causando gravi conseguenze anche in altri Paesi del mondo in cui esporta i propri prodotti e con essi microrganismi e determinanti genici. È, dunque, necessario sensibilizzare i governi a livello mondiale riguardo il problema della resistenza agli antimicrobici, in modo che possano attuare strategie e imporre regole più stringenti nell'utilizzo di queste preziose molecole. Nonostante i tassi di AMR raggiungano livelli molto elevati, l'Europa presenta una legislazione precisa e stringente in termini di utilizzo di antibiotici a livello sanitario, soprattutto nella pratica dell'allevamento con la messa al bando del loro utilizzo a dosi sub-terapeutiche come promotori della crescita, al contrario di altri Paesi. Vi è, dunque, l'estrema necessità di un piano globale di azione e lotta all'AMR.

In conclusione, l'applicazione di analisi molecolari per il rilevamento rapido e accurato dei determinanti di resistenza e di mutazioni genetiche che conferiscono resistenza è cruciale per ridurre e controllare il carico di infezioni da batteri MDR e per guidare nella scelta della terapia più efficace, nonché per comprendere l'epidemiologia e le dinamiche di diffusione nell'ambiente ospedaliero.

La tipizzazione molecolare dei microrganismi patogeni assume, quindi, un ruolo centrale nella sorveglianza e nello studio dell'epidemiologia delle malattie infettive, mostrando un elevato potere discriminante e consentendo la descrizione di situazioni complesse utili ad individuare le strategie d'intervento più efficaci. Nonostante l'evoluzione tecnologica e i vantaggi di un approccio molecolare, l'applicazione di routine non è ancora avvenuta probabilmente a causa dei costi, che via via sono in drastica diminuzione, ma anche alla complessità di analisi che richiede operatori altamente formati. Ciononostante, in questa fase di sostanziale transizione, l'individuazione di Centri di riferimento potrebbe garantire l'applicazione di queste nuove metodiche già da subito nella pratica clinica e nella definizione di idonee politiche di Sanità Pubblica.

Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti nel lavoro di tesi, nel *setting* ospedaliero è necessario migliorare la *stewardship* antimicrobica, riducendo e limitando l'utilizzo di antibiotici al fine di tutelare l'efficacia delle poche molecole verso le quali ancora non si è assistito ad una perdita sostanziale di suscettibilità, come la fosfomicina. Tali strategie andrebbero applicate a livello globale, in quanto la diffusione di microrganismi resistenti e dei geni associati ad essa interessa tutti i comparti di vita.



## 8. Bibliografia

- Acheampong G, Owusu M, Owusu-Ofori A et al. Chromosomal and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in human *Salmonella enterica* infection in Ghana. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):898.
- Agodi A, Barchitta M, Quattrocchi A, et al. Antibiotic trends of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* resistance indicators in an intensive care unit of Southern Italy, 2008-2013. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015;4:43.
- Al Atrouni A, Hamze M, Jisr T, Lemarié C, Eveillard M, Joly-Guillou M, Kempf M. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *Int J Infect Dis*. 2016;52:29-36.
- Al-Hassan L, Zafer MM, El-Mahallawy H. Multiple sequence types responsible for healthcare-associated *Acinetobacter baumannii* dissemination in a single centre in Egypt. *BMC Infect Dis*. 2019;19:829.
- Alkasaby NM, El Sayed Zaki M. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *Int J Microbiol*. 2017;2017:3925868.
- Almomani B, McCullough A, Gharaibeh R, Samrah S, Mahasneh F. Incidence and predictors of 14-day mortality in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in ventilator-associated pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(12):1323-30.
- Alsani M, Kammili N, Lakshmi J, et al. Poverty and Community-Acquired Antimicrobial Resistance with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Organisms, Hyderabad, India. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(8):1490–1496.
- Al-Sultan AA, Evans BA, Aboulmagd E, et al. Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Eastern District of Saudi Arabia. *Front Microbiol*. 2015;6:634.
- Ambler RP. Philos The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31.
- Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*. 2009;11(12):2970-88.
- Amudhan SM, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 2011;29(3):269-74.
- Andersson D, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7):465-78.
- Aoife H, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 2012;3:243-250.
- Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011;104(1):40–45.
- Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011;104(1):40–45.
- Asgin N, Otlu B, Cakmakliogullari E, Celik B. High prevalence of TEM, VIM, and OXA-2 beta-lactamases and clonal diversity among *Acinetobacter baumannii* isolates in Turkey. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2019;13(09):794-801.

- Ashton P, Nair S, Peters T, et al. Revolutionizing Public Health Reference Microbiology using Whole Genome Sequencing: *Salmonella* as an exemplar. bioRxiv; 2015.
- Ashton PM, Nair S, Peters TM, et al. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. PeerJ. 2016;4:e1752.
- Azimi L, Talebi M, Pourshafie MR, Owlia P, Rastegar Lari A. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. Int J Mol Cell Med. 2015;4(1):46–53.
- Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain JM. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. New Microbes New Infect. 2014;3:34–36.
- Bali E, Açık L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. African J Microbiol Research. 2010;4:650-654.
- Bartual S, Seifert H, Hippler C, Luzon M, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(9):4382-4390.
- Basak S, Singh P, Rajurkar M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. J Pathog. 2016;2016:4065603.
- Beatson SA, Walker MJ. Tracking antibiotic resistance- Science, 2014 - science.sciencemag.org
- Bengtsson B, Greko C. Antibiotic resistance consequences for animal health, welfare, and food production. Ups J Med Sci. 2014;119(2):96-102.
- Bennett J, Chung K. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. Adv Appl Microbiol. 2001;163-184.
- Beshiru A, Igbinsola IH, Igbinsola EO. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Elements of *Salmonella* Serovars From Ready-to-Eat (RTE) Shrimps. Front Microbiol. 2019;10:1613.
- Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, et al. In vitro selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(6):2795–2802.
- Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10:917–934.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015 Jan;13(1):42-51.
- Blanchard C, Barnett P, Perlmutter J, Dunman PM. Identification of *Acinetobacter baumannii* serum-associated antibiotic efflux pump inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(11):6360–6370.
- Bokma-Bakker M, Bondt N, Neijenhuis F, Mevius D, Ruiters S. Antibiotic use in Brazilian broiler and pig production: an indication and forecast of trends. [online] Library.wur.nl. 2014 Available at: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/452289> [26 Dicembre 2019].
- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother. 2017;72(12):3317–3324,

- Bradford PA1, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004;39(1):55-60.
- Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):776-778.
- Brigante G, Migliavacca R, Bramati S et al. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61(5):653-661.
- Brusaferro S, Arnoldo L, Cattani G, Fabbro E, Cookson B, Gallagher R, et al. Harmonizing and supporting infection control training in Europe. *Journal of Hospital Infection*. 2015;89(4):351-356.
- Buehler SS, Madison B, Snyder SR, et al. Effectiveness of Practices To Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: a Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(1):59-103.
- Busani L, Graziani C, Luzzi I et al., Report Ecdc Efsa 2017 su zoonosi e malattie a trasmissione alimentare: focus sulla situazione nazionale. <https://www.epicentro.iss.it/tossinfezioni/ReportEcdcEfsa2017>
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-1233.
- Cagnacci S, Gualco L, Roveta S, et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):296-300.
- Cai Y, Dong C, Rui W, Beibei L, Nan B. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1607-1615.
- Caini S, Hajdu A, Kurcz A, Böröcz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005-2010. *Euro Surveill*. 2013;18(2):20352.
- Cao C, Maugeri G, Zingali T, Gona F, Stefani S, Mezzatesta ML. Extensively drug-resistant ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* in an Italian intensive care unit. *New Microbiol*. 2018 Apr;41(2):159-161.
- Calbo E, Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol*. 2015;10(6):1063-75.
- Campos J, Mourão J, Silveira L, et al. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(1):151-154.
- Cannatelli A, D'Andrea M, Giani T et al. In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoPmgrBRegulator. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5521-5526.
- Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013;57(11):5521-5526.
- Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, et al. in vivo evolution to colistin resistance by pmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4399-4403.

- Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. First Detection of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene in *Escherichia coli* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3257–3258.
- Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5696–5703.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413–431.
- Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill*. 2017;22(31):30589.
- Cassini A, Högberg L, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56–66.
- Cassini A, Plachouras D, Eckmanns T, et al. Burden of six healthcare-associated infections on European population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. *PLoS Med*. 2016;13(10):e1002150.
- Centres for Disease Control and Prevention CDC, 2019, <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html> [25 Novembre 2019]
- Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta: CDC; 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Chang KM, Huang WC, Chiou CS, Shen GH, Huang CC, Wen FS. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(3):195–201.
- Chapman B, Gunter C. Local food systems food safety concerns. *Microbiol Spectrum*. 2018;6(2):20.
- Chaudhary M, Anurag P. Prevalence, Genotyping of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates for Oxacillinase Resistance and Mapping Susceptibility Behaviour. *J Microb Biochem Technol*. 2014;6:2.
- Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(6):1255–9.
- Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2909–2913.
- Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5):863.
- Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*. 2014;159(6):1300–1311.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.
- Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: a review. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(1):E1.

- Cohen E, Davidovich M, Rokney A, Valinsky L, Rahav G, Gal-Mor O. Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant *Salmonella enterica* in poultry. *Environ Microbiol.* 2020;22(1):413-432.
- Corbella M, Caltagirone M, Gaiarsa S, et al. Characterization of an outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in Italy. *Microb Drug Resist.* 2018;24(8):1128–1136.
- Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, Ñamendys-Silva SA, Sandoval-Hernández S, Volkow-Fernández P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 2015;31:31-4.
- Coyne L, Arief R, Benigno C, et al. characterizing antimicrobial use in the livestock sector in three south East Asian countries (Indonesia, Thailand, and Vietnam). *Antibiotics (Basel).* 2019;8(1):33.
- Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4389–4393.
- Cristina ML, Sartini M, Ottria G, et al. Epidemiology and biomolecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian hospital. *J Prev Med Hyg.* 2016;57(3):149–156.
- Crump JA, Heyderman RS. A Perspective on Invasive Salmonella Disease in Africa. *Clin Infect Dis.* 2015;61Suppl 4(Suppl 4):S235–S240.
- Da Silva GJ, Domingues S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms.* 2016;4(3):29.
- D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Fighting AMR in the Healthcare Environment: Microbiome-Based Sanitation Approaches and Monitoring Tools. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1535..
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):490-5.
- D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):54–61.
- David N, Jorge Salluh, Ignacio Martin-Loeches, and Pedro Póvoa. Biomarker-guided antibiotic therapy—strengths and limitations *Ann Transl Med.* 2017; 5(10): 208.
- Davoodi S, Boroumand MA, Sephehrisesht S, Pourgholi L. Detection of VIM- and IMP-type Metallo-Beta-Lactamase Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Two Hospitals in Tehran. *Iran J Biotechnol.* 2015;13(1):63–67.
- Day MJ, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A et al. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1178-82.
- Day MR, Doumith M, Do Nascimento V et al. Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(2):365-372.

- Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(31).
- Del Pozo JL, Patel R. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(2):204-9.
- Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014;67:147–151.
- Dettori M, Piana A, Deriu MG, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *New Microbiol*. 2014;37(2):185-91.
- Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*. 2017 Feb 10;243:16-24.
- Dhanani AS, Block G, Dewar K, et al. Correction: Genomic Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148706.
- Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Feb;17(2):197-201.
- Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular Epidemiological Insights into Colistin-Resistant and Carbapenemases-Producing Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3783–3795.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4178–4182.
- Donnarumma F, Indorato C, Mastromei G, et al. Molecular analysis of population structure and antibiotic resistance of *Klebsiella* isolates from a three-year surveillance program in Florence hospitals, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(3):371-8.
- Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):659-67.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid Risk Assessment: Outbreak of Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Lithuania, 2019. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC 2019. [15 Dicembre 2019].
- European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations 2019–2021. ECDC 2019 <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/framework-for-genomic-surveillance.pdf> [19 Dicembre 2019].
- European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. ECDC 2019 <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/whole-genome-sequencing-for-public-health-surveillance.pdf> [24 Dicembre 2019].
- European Centre for Disease Prevention and Control /EMEA. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control. ECDC/EMEA 2009.



European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. ECDC 2013.

European Centre for Disease Prevention and Control- Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. ECDC 2014. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013> [8 Dicembre 2019]

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC 2018

Eckburg PB, Lister T, Walpole S, et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Drug Interaction Potential of SPR741, an Intravenous Potentiator, after Single and Multiple Ascending Doses and When Combined with  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9):e00892-19.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA & ECDC 2017. EFSA J.* 2017;15:5077.

European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of Zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *The EFSA Journal.* 2017.

European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *The EFSA Journal.* 2017;15(2), 212.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018;16(12):5500

European Food Safety Authority, ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal.* 2014;12(2):3547

European Food Safety Authority. (2019). Salmonella the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. *EFSA 2019.* <https://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union> [22 Dicembre 2019]

European Food Safety Authority. EFSA Scientific Opinion on Review of the European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 specifically for the data related to bovine tuberculosis, *Echinococcus*, Q fever, brucellosis and non-food borne diseases. *EFSA Journal* 2012;10(6):2765

Elbashir S, Parveen S, Schwarz J, Rippen T, Jahncke M, DePaola A. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiol.* 2018;70:85-93.

Elnahriry SS, Khalifa HO, Soliman AM, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3249–3250.

Epicentro.iss.it. 2019. *Salmonella* aspetti epidemiologici. <https://www.epicentro.iss.it/salmonella/epidemiologia> [20 Dicembre 2019].

Epicentro.iss.it. 2019. *Salmonella*. <https://www.epicentro.iss.it/salmonella/> [22 Dicembre 2019]

Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, et al. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency “Ospedale dei Colli”, Naples, Italy. *Front Microbiol.* 2018;9:1463.

- EuCAST- European committee on antimicrobial susceptibility testing, 2019 (<http://www.eucast.org/>)
- European committee on antimicrobial susceptibility testing, EUCAST, 2019 Eucast.org. Available from: [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf).
- European Medicines Agency, 2016, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption.
- European Medicines Agency. Annual Report, 2014 ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/annual-report-european-medicines-agency-2014\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/annual-report-european-medicines-agency-2014_en.pdf))
- European Union (EU). 2015. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04). Official Journal of the European Union 11.9.2015. C 299/7-26.
- Evans B, Amyes S. OXA -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*.2014;27(2):241-263.
- Eyre DW, De Silva D, Cole K, et al. WGS to predict antibiotic MICs for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):1937–1947.
- Fàbrega A1, Rosner JL, Martin RG, Solé M, Vila J. SoxS-dependent coregulation of ompN and ydbK in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain, *FEMS Microbiol Lett*. 2012;332(1):61-7.
- Fakruddin M, Sultana R, Nur Hossain M, Mizanur Rahaman M, Kamrul Islam M, Ahmed MM. Occurrence of ingress of Salmonella. in betel leaf (*Piper betle* L.). *Int J Food Contam*. 2017;4, 6.
- Farooqui HH, Selvaraj S, Mehta A, Heymann DL. Community level antibiotic utilization in India and its comparison vis-à-vis European countries: Evidence from pharmaceutical sales data. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204805.
- Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H et al. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(7):642.e1-9.
- Fernández-Cuenca F, Tomás M, Caballero-Moyano FJ et al. Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(12):3222-9.
- Figueiredo R, Card RM, Nunez-Garcia J, Mendonça N, da Silva GJ, Anjum MF. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from food animal and foodstuff may also be less susceptible to heavy metals. 2019. *Foodborne Pathog Dis*. 2019;16(3):166-172.
- Finley R, Reid-Smith R, Weese JS. Human health implications of Salmonella-contaminated natural pet treats and raw pet food. *Clin Infect Dis*. 2006;42(5):686-91.
- Florez-Cuadrado D, Moreno MA, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Adv Food Nutr Res*. 2018;86:115-136.
- Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. Salmonella pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(4):582–607.
- Fontana C, Stefani S, Pan A, et al. From phenotyping to the study of clonal relationship of microbial isolates. *Microbiologia medica*.2013;28(3):118-131.
- Food and Agriculture Organization. 2016. The state of food and agriculture- climate change, agriculture and food security. <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf>



- Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*. 2014;509(7502):612–616.
- Founou RC, Founou LL, Essack SY. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189621.
- Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov*. 2005;2:10.
- Gaiarsa S, Bitar I, Comandatore F, et al. Can Insertion Sequences Proliferation Influence Genomic Plasticity? Comparative Analysis of *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 78, a Persistent Clone in Italian Hospitals. *Front Microbiol*. 2019;10:2080.
- Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, et al. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(3):381–388.
- Gal-Mor O. Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal *Salmonellae*. *Clin Microbiol Rev*. 2018;32(1):e00088-18.
- Garnacho-Montero J, Timsit J. Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(1):69-76.
- Ghamgosha M, Shahrekizahedani S, Kafilzadeh F, Bameri Z, Taheri RA, Farnoosh G. Metallo-beta-Lactamase VIM-1, SPM-1, and IMP-1 genes among clinical *Pseudomonas aeruginosa* species isolated in Zahedan, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(4):e17489.
- Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(9):703–708.
- Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case–control–control study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(12):1106.e1–8.
- Giacometti F, Piva S, Vranckx K, et al. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *Int J Food Microbiol*. 2018;277:50–57.
- Giani T, Arena F, Vaggelli G, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. *J. Clin. Microbiol*. 2015;53(10):3341–3344.
- Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(3):137-46.
- Giguère S, Prescott JF, Dowling PM 2013 Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Google Books. 2020.
- Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, Petri WA Jr, Hewlett EL. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):541–563.
- Giordano C, Klak A, Barnini S, et al. Reduced Fitness Costs of mcr-1.2 Compared to Mutated pmrB in Isogenic Colistin-Resistant KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*. 2019;4(6):e00551-19.
- Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis*. 2016; 8(1):e2016032.

- Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):866-75.
- Gona F, Bongiorno D, Aprile A, et al. Emergence of two novel sequence types (3366 and 3367) NDM-1- and OXA-48-co-producing *K. pneumoniae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(9):1687-1691.
- Govindan Rajamohan G1, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(9):1919-25.
- Granata G, Petrosillo N. Resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*: a 4.0 strain?. *Infect Dis Rep.* 2017;9(2):7104.
- Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 2007. 9th edition
- Grundmann H, Glasner C, Albiger B et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153-163.
- Gupta B, Johnson N. Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in south Asia and the pacific. *PLoS ONE.* 2014;9(11):113385.
- Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. StatPearls Publishing; 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277>. [15 Luglio 2019].
- Haque MM, Sarker MAR, Rifa RA, Islam MA, Khatun MM. Detection of food-borne bacteria in ready to eat betel leaf sold at local markets in Mymensingh. *Veterinary World.* 2017;10(9):1040-1045.
- Harris SR, Cartwright EJ, Török ME, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):130–136.
- Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 2017;18(1):83.
- Hawken SE, Snitkin ES. Genomic epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative organisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1435(1):39–56.
- Hendriksen RS, Munk P, Njage P, et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun.* 2019;10(1):1124.
- Højby N1, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32.
- Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016;387(10014):176-87.
- Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Rugiada Dew, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV & Hanson ND Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4438-4440.
- Huddlestone JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist.* 2014;7:167–176.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465–2466.

- Jacoby G. AmpC -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-182.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New  $\beta$ -Lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352:380-391
- Jafari Z, Harati AA, Haeili M, et al. Molecular Epidemiology and Drug Resistance Pattern of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Microb Drug Resist.* 2019;25(3):336-343.
- Jayol A, Poirel L, Villegas M, Nordmann P. Modulation of mgrB gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(1):108-10.
- Jia W, Li C, Zhang H, Li G, Liu X, Wei J. Prevalence of genes of OXA-23 carbapenemase and AdeABC efflux pump associated with multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates in the ICU of a comprehensive hospital of northwestern China. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(8):10079–10092.
- Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* Isolates by use of Whole-Genome Sequencing data. *J Clin Microbiol.* 2015;53(8):2410–2426.
- Johnson SB, Parker M. The ethics of sequencing infectious disease pathogens for clinical and public health. *Nat Rev Genet.* 2019;20:313–315.
- Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, et al. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology.* 2012;158(Pt 4):1005–1015.
- Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM -2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1260-2.
- Kahn LH. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2017;111(6):255-260.
- Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(1):59-71.
- Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2253-4.
- Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3365–3370.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):302–307.
- Klontz EH, Tomich AD, Günther S, et al. Structure and dynamics of fosA-mediated fosfomycin resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):e01572–17.
- Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(11):E9-E11.
- Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle N. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae : a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1457(1):61-91.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.

- Kuo SC, Chang SC, Wang HY, et al. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis.* 2012;12:200.
- Ladner JT, Grubaugh ND, Pybus OG et al. Precision epidemiology for infectious disease control. *Nat Med.* 2019;25(2):206-211.
- Langridge GC, Nair S, Wain J. Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally. *J Infect Dis.* 2009; 199(4):602–603.
- Laxminarayan R, Duse A, Watal C et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057-98.
- Laxminarayan R1, Duse A, Watal C et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057-98.
- Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55.
- Lee K, Ha GY, Shin BM et al. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(1):51-8.
- Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2148–2150.
- LeLièvre V, Besnard A, Schlüsselhuber M, Desmasures N, Dalmasso M. Phages for biocontrol in foods: What opportunities for *Salmonella* sp. control along the dairy food chain? *Food Microbiol.* 2019;78:89-98.
- Li H, Wang Q, Wang R, Zhang Y, Wang X, Wang H. Global regulator SoxR is a negative regulator of efflux pump gene expression and affects antibiotic resistance and fitness in *Acinetobacter baumannii*. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(24):e7188.
- Liakopoulos A, Geurts Y, Dierikx CM, et al. Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Strains, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1257–1261.
- Lima Barbieri N, Nielsen DW, Wannemuehler Y, et al. mcr-1 identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One.* 2017;12(3):e0172997.
- Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases.* 2014; 2(12):787–814.
- Littmann J, Viens AM. The ethical significance of antimicrobial resistance. *Public Health Ethics.* 2015;8(3):209-224.
- Liu Y, Wang Y, Walsh T et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-168.
- Lomonaco S, Crawford MA, Lascols C, et al. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198526.

- López-Camacho E, Gómez-Gil R, Tobes R, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(3):632–636.
- Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem.* 2019 May 15;573:17-29.
- Lorenzin G, Scaltriti E, Gargiulo F et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units in northern Italy: a genomic approach to characterize new sequence types *Future Microbiol.* 2019;14:1281-1292.
- Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):728–736.
- Mair-Jenkins J, Borges-Stewart R, Harbour C, et al. Investigation using whole genome sequencing of a prolonged restaurant outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to the building drainage system, England, February 2015 to March 2016. *Euro Surveill.* 2017;22(49):17-00037.
- Mamma C, Bonura C, Di Bernardo F et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.* 2012;17(33). pii: 20248.
- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):718-33.
- Martinez T, Martinez I, Vazquez GJ, Aquino EE, Robledo IE. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J Med Microb.* 2016;65(8):784–792.
- Martínez-Martínez L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:82-9.
- McEwen S, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr.* 2018;6(2).
- McLauchlin J, Aird H, Andrews N et al. Public health risks associated with *Salmonella* contamination of imported edible betel leaves: Analysis of results from England, 2011–2017. *Int J Food Microbiol.* 2019 Jun 2;298:1-10.
- McLauchlin J, Aird H, Charlett A et al. Imported edible leaves collected at retail sale in England during 2017 with an emphasis on betel and curry leaves: microbiological quality with respect to *Salmonella*, shiga-toxin-producing *E. Coli* (STEC) and levels of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 2018;125(4):1175-1185.
- Menichetti F, Falcone M, Lopalco P et al. The GISA call to action for the appropriate use of antimicrobials and the control of antimicrobial resistance in Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52(2):127-134.
- Messineo A, Marsella LT. Biological hazards and healthcare-associated infections in Italian healthcare facilities: some considerations on inspections and accountability. *Ann Ig.* 2015;27(6):799-807.
- Mezzatesta ML, Trovato G, Gona F et al. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008;7:4.
- Mohd Sazlly Lim S, Sime F, Roberts J. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Current evidence on treatment options and the role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in dose optimisation. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Jun;53(6):726-745.

- Mohd Sazlly Lim S, Wong PL, Sulaiman H, Atiya N, Hisham Shunmugam R, Liew SM. Clinical prediction models for ESBL-*Enterobacteriaceae* colonization or infection: a systematic review. *J Hosp Infect.* 2019;102(1):8-16.
- Monaco M, Giani T, Raffone M. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(42):20939.
- Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio.* 2017;8(1):e01976-16.
- Moura Q, Fernandes MR, Silva KC, et al. Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. *Virulence.* 2018;9(1):281–286.
- Mourão J, Novais C, Machado J, Peixe L, Antunes P. Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. *Intern J Antimicrob Ag.* 2015;45(6):610-616.
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539.
- Muloi D, Ward MJ, Pedersen AB, Fèvre EM, Woolhouse MEJ, van Bunnik BAD. Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(8):467–474.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785–796.
- Nahar N, Das S, Sufian, , Khairul Isla M, Akter H. Prevalence of microbial loads on betel leaf with special emphasis on multidrug resistance *Salmonella* spp. and its public health implications. *Int J Environ Agric Biotechnol.* 2018;3:1582–1589.
- Nair S, Ashton P, Doumith M et al. WGS for surveillance of antimicrobial resistance: a pilot study to detect the prevalence and mechanism of resistance to azithromycin in a UK population of non-typhoidal *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3400-3408.
- Nat Rev Genet. A genomic approach to microbiology. 20, 311 (2019) <https://www.nature.com/articles/s41576-019-0131-5.pdf>
- Navidinia M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Archives of Advanced in Bioscience.* 2016;7(3):43-57
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017;41(3):252–275.
- Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):818–820.
- Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019;74:103935.
- Nepal G, Bhatta S. Self-medication with Antibiotics in WHO Southeast Asian Region: A Systematic Review. *Cureus.* 2018;10(4):e2428.
- Neuert S, Nair S, Day MR, et al. Prediction of Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles From Whole Genome Sequences of Non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Front Microbiol.* 2018;9:592.

- Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci.* 2017;4:126.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited microbiology and molecular biology. *Reviews Dec.* 2003;67(4):593-656.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Disease* 2009;9(4):228-236.
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1038–1043.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–1798.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503–1507.
- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):821-30.
- Nowak J, Zander E, Stefanik D, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(12):3277-3282.
- Nowak J, Schneiders T, Seifert H, Higgins PG. The Asp20-to-Asn Substitution in the Response Regulator AdeR Leads to Enhanced Efflux Activity of AdeB in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(2):1085–1090.
- Nowak J, Seifert H, Higgins PG. Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin. *J Med Microbiol.* 2015;64(6):630-5.
- Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance-role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):61-74.



- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643.
- O'Neill Jim Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2016.
- Ortwine JK, Sutton JD, Kaye KS, et al. Strategies for the safe use of colistin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13:1237–1247.
- Orwa J, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Isolation and structural characterization of polymyxin B components. *J Chromatogr A.* 2001;912(2):369-73.
- Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control.* 2013;41(5):S6-11.
- Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629–661.
- Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Microbiol.* 2016;47(4):785-792.
- Pagès JM, James CE, Winterhalter M.T he porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):893-903.
- Palacios-Baena ZR, Gutiérrez-Gutiérrez B, Calbo E, et al. Empiric Therapy With Carbapenem-Sparing Regimens for Bloodstream Infections due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Results From the INCREMENT Cohort. *Clin Infect Dis.* 2017;65(10):1615–1623.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943–4960.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–686.
- Pecora ND, Li N, Allard M, et al. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. *mBio.* 2015;6(4):e01030.
- Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):305-9.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538–582.
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(10):3471–3484.
- Pérez-Rodríguez F, Mercanoglu Taban B. A State-of-Art Review on Multi-Drug Resistant Pathogens in Foods of Animal Origin: Risk Factors and Mitigation Strategies. *Front Microbiol.* 2019;10:2091
- Perilli M, Sabatini A, Pontieri E. OXA-23 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Type: First Identification in L'Aquila Hospital (Italy). *Microb Drug Resist.* 2015;21(1):97-101.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1–11.



- Piddock L. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:629–636.
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7592–7594.
- Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873–5884.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15–22.
- Poirel L, Jayol A, Bontron S et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75–80.
- Poirel L, Jayol A, Bontron S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75–80.
- Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol and Infect.* 2006;12(9):826–836.
- Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(1):52–9
- Pornsukarom S, van Vliet AHM, Thakur S. Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics.* 2018;19(1):801.
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon *Pathog Glob Health.* 2015;109(7): 309–318.
- Pribul BR, Festivo ML, Rodrigues MS, et al. Characteristics of Quinolone Resistance in *Salmonella* spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. *Front Microbiol.* 2017;8:299.
- Principe L, Piazza A, Giani T, et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3004–3010.
- Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1106–1109.
- Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(4):1015–1063.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–458.
- Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis.* 2015;60(9):1295–1303.
- Rawat D, Nair D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):263–274.
- Rello J, Kalwaje Eshwara V, Lagunes L, et al. A global priority list of the T<sub>Op</sub> T<sub>En</sub> resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019;38(2):319–323

- Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2003;52(3):477-80.
- Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. J Infect Dis. 2008;197(8):1079-81.
- Riley L.W. () Advanced Microbial Strain Subtyping Techniques for Molecular Epidemiology Investigations. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology.2018;137-163.
- Ripabelli G, Salzo A, Mariano A., Healthcare-associated infections point prevalence survey and antimicrobials use in acute care hospitals (PPS 2016–2017) and long-term care facilities (HALT-3): a comprehensive report of the first experience in Molise Region, Central Italy, and targeted intervention strategies. J Infect Public Health. 2019;12(4):509-515.
- Ripabelli G, Tamburro M, Guerrizio G, et al. Tracking Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian Hospital: Molecular Epidemiology and Surveillance by PFGE, RAPD and PCR-Based Resistance Genes Prevalence. Curr. Microbiol. 2018; 75(8), 977–987.
- Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016;110(7):377–380.
- Rodriguez-Martinez J, Nordmann P, Ronco E, Poirel L. Extended-Spectrum Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(8):3484-3488.
- Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Périchon B. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2504–2510.
- Roth N, Hofacre C, Zitz U, et al. Prevalence of antibiotic-resistant E. coli in broilers challenged with a multi-resistant E. coli strain and received ampicillin, an organic acid-based feed additive or a synbiotic preparation. Poult Sci. 2019;98(6):2598–2607.
- Rumbo C, Gato E, López M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and  $\beta$ -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5247–5257.
- Sabat AJ, van Zanten E, Akkerboom V, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. Sci Rep. 2017;7(1):3434.
- Sabbatucci M, Iacchini S, Iannazzo S, et al. Sorveglianza nazionale delle batteriemie da enterobatteri produttori di carbapenemasi. Rapporti ISTISAN 17/18 ISSN:1123-3117.
- Safari M, Mozaffari Nejad AS, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci. 2015;22(4):424–429.
- Sammarco ML, Ripabelli G, Tamburro M. Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati. Ann Ig. 2014;26:10–45.
- Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(6):525-529.
- Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067.

- Saoussen Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like  $\beta$ -lactamases. *Journal J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1059-63.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):7-15.
- Schwaber MJ, Lev B, Israeli A et al. Containment of a countrywide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011;52(7):848-55
- Shah DH, Narayan C. Paul, Willium C. Sischo, Rocio Crespo, Jean Guard, Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated Salmonella serotypes. *Poultry Science.* 2017;96(3):687-702.
- Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Nasr Esfahani B, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter infections*. *Environ Health Prev Med.* 2017;22(1):44.
- Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhandu T, Pathania R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):68-74.
- Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Pseudomonas aeruginosa biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals.* 2014;42(1):1-7.
- Shenoy KA, Jyothi EK, Ravikumar R. Phenotypic identification & molecular detection of bla (ndm-1) gene in multidrug resistant Gram-negative bacilli in a tertiary care centre. *Indian J Med Res.* 2014;139(4):625-631.
- Shin SY, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Kim JM, Lee K. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 2):239-45.
- Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):865-891.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL & Zervos MJ (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews;* 19(3):512-530.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):512-530.
- Singh PN, Natto Z, Yel D, Job J, Knutsen S. Betel quid use in relation to infectious disease outcomes in Cambodia. *Int J Infect Dis.* 2012;16(4):e262-e267.
- Sinha B, van Assen S, Friedrich AW. Important issues for perioperative systemic antimicrobial prophylaxis in surgery. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2014;27(4):377-81.
- Sirot D, Sirot J, Labia R et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20(3):323-34.
- Sisto A, D'Ancona F, Meledandri M et al. Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from Micronet network hospitals, Italy, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2012;17(33):20247.
- Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(47):19045.

- Spellberg B, Bonomo RA. "Airborne assault": a new dimension in *Acinetobacter baumannii* transmission\*. Crit Care Med. 2013;41(8):2042–2044.
- Spellberg B, Bonomo RA. The deadly impact of extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Crit Care Med. 2014;42(5):1289–1291.
- Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. Role of AbeS, a Novel Efflux Pump of the SMR Family of Transporters, in Resistance to Antimicrobial Agents in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents and Chemother. 2009;53(12):5312–5316.
- Stockwell VO, Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture. Rev Sci Tech. 2012;31(1):199-210.
- Struelens MJ, Brisse S. From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. Euro Surveill. 2013;18(4):20386.
- Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4362–4364.
- Suetens C, Latour K, Kärki T, et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017 [published correction appears in Euro Surveill. 2018;23(47):]. Euro Surveill. 2018;23(46):1800516.
- Suez J, Porwollik S, Dagan A, et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal Salmonella accounted for invasive disease in humans. PLoS One. 2013;8(3):e58449.
- Sykes JE. Canine and Feline Infectious Diseases 1st Edition. 2013.
- Tacconelli E, Sifakis F, Harbarth S et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):e99-e106.
- Tang S, Orsi RH, Luo H, et al. Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for Salmonella. Front Microbiol. 2019;10:1591.
- Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Nov 30;78:3-13.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233
- Thanner S, Drissner D, Walsh F. Antimicrobial resistance in agriculture. Mbio. 2016;7(2):02227-15.
- Tiba-Casas MR, Camargo CH, Soares FB, Doi Y, Fernandes SA. Emergence of CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg associated with IncII plasmids isolated from poultry in Brazil. Microbial Drug Resistance. Microb Drug Resist. 2019;25(2):271-276.
- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(1):521-524.
- Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):329–332.

- Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. PLoS One. 2016;11(4):e0153014.
- Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis. 2006;12(6):981–983.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):682–707.
- U.S. International Trade Commission. Brazil: Competitive Factors in Brazil Affecting U.S. and Brazilian Agricultural Sales in Selected Third Country Markets. 2012. Investigation No. 332-524. [www.usitc.gov/publications/332/pub4310.pdf](http://www.usitc.gov/publications/332/pub4310.pdf)
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(18):5649-54.
- Van Goethem N, Descamps T, Devleeschauwer B, et al. Status and potential of bacterial genomics for public health practice: a scoping review. Implement Sci. 2019;14(1):79.
- Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. Future Microbiol. 2013;8(6):711–724.
- Venditti C, Vulcano A, D'Arezzo S et al. Epidemiological investigation of an *Acinetobacter baumannii* outbreak using core genome multilocus sequence typing. J Glob Antimicrob Resist. 2019;17:245-249.
- Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(7):2643-69.
- Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. Clin Infect Dis. 2002;34 Suppl 3:S107-10.
- Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Drugs. 2014;74(12):1315–1333.
- Vijayakumar S, Gopi R, Gunasekaran P, et al. Molecular Characterization of Invasive Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from a Tertiary Care Hospital in South India. Infect Dis Ther. 2016;5(3):379–387.
- Voulgari E, Politi L, Pitiriga V et al. First report of an NDM-1 metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. Int J Antimicrob Agents. 2016 Dec;48(6):761-762.

- Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;234(2):209-13.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(3):470-82.
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, et al. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-8* and Its Variant in *Raoultella ornithinolytica*. *Front Microbiol.* 2019;10:228.
- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(5):525-33.
- Willis C, Sadler-Reeves L, Elviss N et al. An assessment of the microbiological safety of fresh whole-leaf herbs from retail premises in the United Kingdom with a focus on *Salmonella* spp. *J Appl Microbiol.* 2015;119(3):827-33.
- Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM. Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS One.* 2018;13(4):0195281.
- Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):409-447.
- World Health Organization, 2019 Available at: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/> WHO. 2019. [24 Dicembre 2019]
- World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: WHO. 2001
- World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO. 2014
- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO 2017. [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf) [24 Dicembre 2019]
- World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; WHO 2012
- World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO 2015. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf) [24 Dicembre 2019]
- World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO 2001. [https://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_English.pdf](https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf)
- Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):536-543.
- Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(5):490-6.

- Xavier BB1, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016 Jul 7;21(27).
- Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2018;73(7):1791-1795.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [published correction appears in Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):809]. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):1151-1161.
- Yin W, Li H, Shen Y, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli* [published correction appears in MBio. 2017 Aug 15;8(4):]. mBio. 2017;8(3):e00543-17.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-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. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(12):5046-5054.
- Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries. 2009;3(5):335-41.
- Zhan Z, Xu X, Gu Z, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal *Salmonella* in China, 2007-2016. Infect Drug Resist. 2019;12:2885-2897.
- Zhang T, Wang M, Xie Y, et al. Active efflux pump *adeB* is involved in multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* induced by antibacterial agents. Exp Ther Med. 2017;13(4):1538-1546.
- Zhao S, Jiang DY, Xu PC, et al. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;14:7.
- Zhou K, Fu C, Yang S. Big data driven smart energy management: From big data to big insights. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016;56:215-225.
- Ziółkowski G, Pawłowska I, Krawczyk L, Wojkowska-Mach J. Antibiotic consumption versus the prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Clostridium difficile* infections at an ICU from 2014-2015. J Infect Public Health. 2018;11(5):626-630.
- Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep. 2015;5:15082.
- Zuraw L. Perdue announces dramatic reduction in antibiotic use in its chickens. Food safety News. 2014. <http://www.foodsafetynews.com/2014/09/perdue-dramatically-reduces-antibiotic-use-in-chickens/#.VQZbbtKUd8E>.