



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SANITA ANIMALE E ZONOSI
CICLO XXXVII

Settore Scientifico Disciplinare: MVET/03A

**ISOLAMENTO DI BATTERI APPARTENENTI ALLA FAMIGLIA
DELLE ENTEROBATTERIACEE RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI IN
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE E VEGETALE: ANALISI
GENOMICA E IMPLICAZIONI PER LA SICUREZZA ALIMENTARE**

Dottorando:
Dott.ssa **Rosa FRACCALVIERI**

Coordinatore:
Ch.mo Prof.ssa **Maria TEMPESTA**

Tutor:
Ch.ma Prof.ssa **Maria TEMPESTA**

Co-Tutor:
Dott. **Antonio PARISI**

ESAME FINALE 2025

RIASSUNTO

L'antibiotico-resistenza (AMR) rappresenta una delle più gravi minacce alla salute pubblica globale, con una proiezione di 10 milioni di morti annue entro il 2050. La World Health Organisation (WHO) e altre organizzazioni internazionali sottolineano la necessità di un approccio coordinato, in particolare attraverso la visione integrata "One Health", che considera la salute umana, animale e ambientale come interconnesse.

In ambito clinico la AMR interessa sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Tra i Gram-negativi, gli enterobatteri sono i patogeni più frequenti sia in ambito ospedaliero che in ambito comunitario, con un notevole impatto in termini di mortalità e morbilità nell'ambito delle infezioni da batteri antibiotico-resistenti. Questi batteri sviluppano resistenza attraverso mutazioni spontanee o trasferimento orizzontale di geni, mediante coniugazione, trasformazione o trasduzione. Questi trasferimenti possono avvenire nel suolo e nell'acqua, così come nel tratto digestivo di esseri umani e animali, nonché negli alimenti. La circolazione di tali ceppi negli animali e nei loro prodotti rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana, soprattutto in considerazione del fatto che i geni che codificano per i determinanti di resistenza sono spesso associati a elementi genetici mobili che possono essere trasferiti a batteri sia commensali sia patogeni, anche generi e specie diversi. Gli Enterobatteri sono in grado di sviluppare resistenze a diverse classi di antibiotici. La produzione di enzimi che idrolizzano e inattivano gli antibiotici β -lattamici quali penicilline, cefalosporine (comprese quelle di terza e quarta generazione), monobattami ed anche carbapenemi, è il meccanismo di resistenza più importante nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*. La resistenza è conseguente a mutazioni a carico di geni codificanti una o più β -lattamasi. Gli Enterobatteri produttori di β -lattamasi spesso presentano resistenze aggiuntive nei confronti di antibiotici non β -lattamici, inclusi aminoglicosidi, fluorochinoloni, trimetoprim, tetracicline, sulfamidici e cloramfenicoli. Le *Enterobacteriaceae* presentano resistenza anche alla colistina, antibiotico di ultima istanza per il trattamento delle infezioni umane causate da batteri Gram-negativi multi-resistenti, in particolare ceppi resistenti ai carbapenemi nell'uomo. Per fronteggiare il problema dell'AMR è necessario l'uso prudente degli antibiotici al fine di preservarne l'efficacia. A tale scopo la WHO ha classificato come critici (CIA, Critically Important Antimicrobials) alcuni principi

attivi indispensabili per la cura di importanti infezioni umane, la cui efficacia terapeutica dev'essere preservata nel tempo. L'elenco degli antibiotici CIA comprende carbapenemi, polimixine (colistina), cefalosporine di 3^a, 4^a e 5^a generazione, fluorochinoloni e macrolidi.

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 in batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da alimenti di origine animale e vegetale con particolare attenzione agli antibiotici considerati critici quali colistina e β -lattamici (inclusi i carbapenemi).

Lo studio evidenzia che l'8,6% degli alimenti esaminati, di cui il 3,2% costituito da alimenti ready-to-eat e il 5,4% alimenti crudi, veicola isolati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* resistenti a colistina, e/o produttori di ESBL ed AmpC.

È stata evidenziata una circolazione di *Enterobacteriaceae* multi-farmaco-resistenti (MDR) nel 7,4% (74/1.000) degli alimenti esaminati. Sono stati isolati 90 ceppi da 86 alimenti.

Il sequenziamento, eseguito con tecnologia Illumina, ha permesso di constatare la presenza di numerosi geni che codificano per fattori di antibiotico-resistenza e di virulenza e plasmidi.

In 35 isolati erano presenti almeno uno dei tre geni *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV* che conferiscono la capacità di produrre Beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), con una maggiore prevalenza del gene *CTX-M*. Sette isolati sono risultati positivi alla presenza di almeno un gene del gruppo *mcr* che conferisce resistenza alla colistina. Si tratta di geni trasportati da plasmidi, ovvero elementi mobili, potenzialmente trasferibili da batterio a batterio, anche tra specie diverse, e quindi potenzialmente più diffusibili. L'analisi genomica ha rivelato un totale di 204 geni di virulenza (VGs) associati a diversi meccanismi di virulenza e patogenicità negli isolati. Sono stati identificati un totale di 52 plasmidi negli isolati analizzati. In particolare, in quattro dei sette isolati contenenti il gene *mcr*, sono state trovate parti attribuibili ai plasmidi IncHI2, noti per il loro ruolo nella diffusione del gene *mcr* nei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno evidenziato la presenza di *Enterobacteriaceae* resistenti agli antimicrobici in diverse fonti alimentari, inclusi alimenti pronti al consumo, che presentano resistenza non solo agli antibiotici di uso comune, ma anche a molecole annoverate

nella lista dei Critically Important Antimicrobials come la colistina o le cefalosporine, antibiotici di ultima risorsa utili per il trattamento delle infezioni multiresistenti nell'uomo. L'analisi genomica ha rivelato la presenza di geni di resistenza antimicrobica (AMR) e di virulenza che potrebbero essere potenzialmente trasferiti da batteri commensali a batteri patogeni, rappresentando una preoccupazione per la salute pubblica. Oltre ad individuare numerosi plasmidi noti per il loro ruolo nella diffusione dei geni AMR nei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

L'applicazione delle analisi molecolari per il rilevamento rapido e accurato dei determinanti di resistenza è cruciale per ridurre e controllare il carico di infezioni da batteri MDR e per comprendere l'epidemiologia e le dinamiche di diffusione dei geni che conferiscono resistenza antibiotica.

Per contrastare la diffusione dell'antibiotico-resistenza appare chiaro come sia assolutamente necessario destinare maggiori risorse in questo campo per poter formulare piani di prevenzione e di contrasto più efficaci.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents one of the most serious threats to global public health, with projections of 10 million deaths annually by 2050. The WHO and other international organizations emphasize the need for a coordinated approach, particularly through the integrated "One Health" vision, which considers human, animal, and environmental health as interconnected.

In the clinical context, AMR affects both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Among Gram-negatives, *Enterobacteriaceae* are the most frequent pathogens both in hospitals and in the community, with a significant impact on morbidity and mortality from infections caused by antibiotic-resistant bacteria. These bacteria develop resistance through spontaneous mutations or gene transfer via horizontal gene transfer mechanisms, such as conjugation, transformation, and transduction. These transfers can occur in soil, water, the digestive systems of humans and animals, and in food. The circulation of these strains in animals and their products poses a

potential threat to human health, especially since the genes encoding these resistance determinants are often associated with mobile genetic elements that can transfer to both commensal and pathogenic bacteria, even across different genera and species. *Enterobacteriaceae* can develop resistance to various classes of antibiotics. The production of enzymes capable of hydrolysing and inactivating β -lactam antibiotics such as penicillin, first and third generation cephalosporins, monobactams, and even carbapenems is the most important resistance mechanism in the *Enterobacteriaceae* family. Resistance is due to some mutated resistance genes encoding one or more β -lactamases. β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* often exhibit resistance to additional non- β -lactam antibiotics, including aminoglycosides, fluoroquinolones, trimethoprim, tetracyclines, sulphonamides, and chloramphenicol. *Enterobacteriaceae* have also developed resistance to colistin, a *last-resort* antibiotic for treating human infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, particularly carbapenem-resistant strains. It is necessary to limit the use of antibiotics as much as possible in order to preserve their effectiveness. For this purpose, the WHO has classified certain active compounds as Critically Important Antimicrobials (CIA), vital for treating major human infections, whose therapeutic efficacy must be safeguarded. The CIA list includes carbapenems, polymyxins (colistin), third, fourth, and fifth-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and macrolides.

In this context, this thesis contributes to the collection and analysis of epidemiological data on antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from animal and plant derived foods, focusing on critical antibiotics such as colistin and β -lactams (including carbapenems) using genomic techniques.

The results show that 8.6% of the tested foods were positive for *Enterobacteriaceae* resistant to colistin and/or ESBL (Extended-Spectrum β -Lactamases) and AmpC producers. Of these 3.2% were ready-to-eat foods, and 5.4% were raw foods. The circulation of multidrug-resistant (MDR) *Enterobacteriaceae* was observed in 7.4% (74/1,000) of the examined foods. Sequencing performed with Illumina technology identified numerous genes encoding antimicrobial resistance factors, virulence factors, and plasmids.

At least one of the three genes *bla*CTX-M, *bla*TEM, and *bla*SHV, which confer extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production, was present in 35 isolates, with CTX-M being the most prevalent. Seven isolates tested positive for at least one *mcr* gene conferring colistin resistance. These genes are plasmid-borne mobile elements that can potentially be transferred between bacteria, even across species, increasing the risk of widespread dissemination. Genomic analysis revealed 204 virulence genes (VGs) associated with various pathogenicity mechanisms. A total of 52 plasmids were identified. Notably, in four of the seven *mcr*-positive isolates, parts of IncHI2 plasmids, known for their role in spreading the *mcr* gene within *Enterobacteriaceae*, were detected.

In conclusion, the study highlighted the presence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in various food sources, including ready-to-eat foods, with resistance not only to common antibiotics but also to Critically Important Antimicrobials like colistin and cephalosporins, crucial for treating multidrug-resistant infections in humans. Genomic analysis revealed the presence of AMR and virulence genes that could potentially be transferred from commensal to pathogenic bacteria, raising public health concerns. The identification of numerous plasmids involved in AMR gene dissemination within *Enterobacteriaceae*.

The application of molecular analyses for the rapid and accurate detection of resistance determinants is crucial for reducing and controlling the burden of infections caused by MDR bacteria and for understanding the epidemiology and dynamics of antibiotic resistance gene dissemination.

To combat the spread of antimicrobial resistance, greater resources must be allocated to this field to develop more effective prevention and control plans.

INDICE

1. INTRODUZIONE	9
1.1 <i>Enterobacteriaceae</i> definizione e classificazione	11
1.2 La resistenza agli antibiotici: un problema globale	13
1.2.1 Uso di antimicrobici nell'uomo, negli animali e nelle piante	16
1.2.2 Alimenti e antibiotico-resistenza	21
2. MECCANISMI DELLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI	24
3. ANTIBIOTICI β -lattamici	31
3.1 β -lattamasi	33
3.1.1 β -lattamasi a spettro esteso (ESBL-Extended Spectrum β -lattamasi)	34
3.1.2 β -lattamasi AmpC	35
3.1.3 β -lattamasi Carbapenemasi	36
4. COLISTINA	39
4.1 La resistenza alla colistina	40
5. SCOPO DELLA TESI	43
6. METODICHE UTILIZZATE	45
6.1 Terreni di coltura selettivi e differenziali	45
6.2 Test di sensibilità agli antibiotici	48
6.2.1 Metodi di diluizione: Minima Concentrazione Inibente (MIC)	48
6.2.2. Metodi di diffusione: Kirby-Bauer	49
6.2.3 Interpretazione	52
6.3 Test di conferma	52
6.4 Metodi automatizzati di identificazione – MALDI-TOF	54
6.5 Whole Genome Sequencing (WGS) con piattaforma ILLUMINA	56
7. MATERIALI E METODI	59
7.1 Campionamento	59
7.2 Isolamento di Enterobatteri resistenti agli antibiotici	61
7.2.1 Preparazione della sospensione iniziale e arricchimento selettivo	61

7.2.2 Isolamento di Enterobatteri su terreni di coltura cromogeni	62
7.3. Identificazione degli isolati mediante analisi MALDI-TOF	64
7.4 Prove di conferma	65
7.4.1 Produzione di ESBL e AmpC: Test di combinazione	67
7.4.2 Resistenza alla Colistina: Minima Concentrazione Inibente (MIC)	71
7.4.3 Resistenza ai carbapenemi e test di sinergia	72
7.5 Test di sensibilità agli antibiotici Minima Concentrazione Inibente	75
7.6 Estrazione del DNA	77
7.7 Whole Genome Sequencing (WGS)	78
8. RISULTATI	79
8.1 Isolamento di Enterobatteri dai terreni cromogeni	79
8.2 Identificazione degli isolati mediante tecnica MALDI TOF	79
8.3 Test di conferma	81
8.4 Test di sensibilità agli antibiotici Minima Concentrazione Inibente	87
8.5 Geni antibiotico-resistenza, virulenza e plasmidi (WGS)	94
9. DISCUSSIONE	111
10. CONCLUSIONI	126
11. BIBLIOGRAFIA	128
RINGRAZIAMENTI	139

1. INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza (AMR, dall'acronimo inglese Anti-Microbial Resistance) ovvero la capacità di un batterio di resistere all'attività di uno o più antibiotici è emersa come una delle principali minacce per la salute pubblica del 21° secolo e potrebbe uccidere 10 milioni di persone all'anno entro il 2050 (Murray *et al.*, 2022). La World Health Organization (WHO), nel suo "World Report on ageing and health" del 2015 (World Health Organization, 2015), considera l'antimicrobico-resistenza (AMR) come una delle più importanti minacce alla salute globale che richiede un piano d'azione globale e coordinato per affrontarlo. La lotta alla AMR è una priorità per l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), nonché per le autorità sanitarie pubbliche Nazionali, 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.

In ambito clinico la AMR interessa sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Tra i Gram-negativi, gli enterobatteri sono i patogeni più frequenti sia in ambito ospedaliero che in ambito comunitario, con un notevole impatto in termini di mortalità e morbosità nell'ambito delle infezioni da batteri antibiotico-resistenti (Cassini *et al.*, 2019).

Gli Enterobatteri sono in grado di sviluppare resistenze a diverse classi di antibiotici. 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 *et al.*, 2015). Questi trasferimenti possono avvenire nel suolo e nell'acqua, ma anche nel sistema digestivo di esseri umani e animali, nonché negli alimenti (Florez-Cuadrado *et al.*, 2018). Il cibo può essere contaminato da batteri AMR e/o geni

AMR in molti modi. I prodotti animali possono contenere batteri AMR a causa della contaminazione fecale durante la macellazione. Anche l'ambiente, compresi gli esseri umani, può contaminare il cibo. Tale contaminazione può verificarsi dopo la lavorazione del cibo e quindi è chiamata contaminazione successiva (Florez-Cuadrado *et al.*, 2018).

E' in aumento la circolazione di enterobatteri MDR (Multiple Drug Resistance), oltre che produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), resistenti alla colistina e ai carbapenemi (van Duijn *et al.*, 2011; Thaden *et al.*, 2016). Spesso si trovano negli alimenti e nell'ambiente, oltre ad essere patogeni opportunisti negli animali (Ojer-Usoz *et al.*, 2017; Bourdichon *et al.*, 2021). La circolazione di tali ceppi negli animali e nei loro prodotti rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana, soprattutto in considerazione del fatto che i geni che codificano per tali determinanti di resistenza sono spesso associati a elementi genetici mobili che possono essere trasferiti a batteri sia commensali sia patogeni, anche di altri generi e specie (Partridge *et al.*, 2018). Il contesto genetico in cui è inserito un gene di resistenza agli antibiotici può riflettere la sua mobilità all'interno della popolazione batterica. È, quindi, di estrema necessità monitorare la loro presenza negli isolati, per comprenderne il contesto genetico e per delinearne e prevederne i percorsi di diffusione. 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*". 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 negli alimenti.

1.1 *Enterobacteriaceae* definizione e classificazione

Gli enterobatteri sono bacilli Gram-negativi aerobi/anaerobi facoltativi, capaci di fermentare il glucosio e negativi al test dell'ossidasi. Possono essere capsulati o a-capsulati, mobili o immobili e la maggioranza di essi è provvista di fimbrie adesive, con le quali sono in grado di aderire alla membrana delle cellule dell'organismo ospite. Gli enterobatteri hanno vari fattori di virulenza quali ad esempio: la capsula che protegge dalla fagocitosi; gli antigeni H e K che se espressi alterano l'efficacia della risposta immune specifica; l'endotossina (LPS) la cui attività tossica risiede nel lipide A che viene rilasciato nella lisi batterica e causa molti effetti sistemici, fra cui attivazione del complemento, rilascio di citochine, leucocitosi, coagulazione disseminata, diminuzione della circolazione periferica, shock, morte.

Gli enterobatteri comprendono molte specie diverse, alcune di grande rilevanza clinica e come componenti tipici del microbiota intestinale dell'uomo e di molti altri animali hanno una distribuzione ubiquitaria e possono ritrovarsi nell'ambiente, dove la loro presenza è utilizzata anche come indicatore di contaminazione fecale.

Alcune specie hanno evoluto specifici determinanti di patogenicità che le rendono capaci di causare malattie anche nell'ospite normale (e. g. *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* enteropatogeni) mentre altre si comportano tipicamente da patogeni opportunisti, potendo causare infezioni in sedi extra-intestinali in concomitanza di una compromissione delle difese dell'ospite (e. g. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp.) (Hu and Torres, 2015). Complessivamente gli enterobatteri sono tra le cause più frequenti di infezioni associate alle pratiche assistenziali (European Centre for Disease Prevention and

Control., 2013), e sono altresì responsabili di molte infezioni di origine comunitaria (ad es. infezioni intestinali, infezioni urinarie e sepsi). Nel corso degli anni la tassonomia degli enterobatteri è stata oggetto di numerose revisioni. Recentemente è stata proposta una ulteriore revisione sulla base delle nuove conoscenze rese disponibili con i dati di sequenziamento genomico su larga scala che ha portato ad una rivisitazione profonda della tassonomia degli enterobatteri, che sono adesso inclusi nell'ordine, *Enterobacterales* (Janda and Abbott, 2021), che comprende sette famiglie (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Budviciaceae*). Le specie batteriche di maggior rilevanza clinica sono, tra le *Enterobacteriaceae*, quelle appartenenti ai generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Citrobacter* ed *Enterobacter*, tra le *Yersiniaceae* quelle appartenenti ai generi *Yersinia* e *Serratia* e, tra le *Morganellaceae*, quelle appartenenti ai generi *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* (Adeolu *et al.*, 2016).

Gli Enterobatteri sono in grado di sviluppare resistenze a diverse classi di antibiotici. 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 *et al.*, 2015). La produzione di enzimi in grado di idrolizzare e inattivare gli antibiotici β -lattamici quali penicilline, cefalosporine di prima e terza generazione, monobattami ed anche carbapenemi, è il meccanismo di resistenza più importante nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*. La resistenza è dovuta ad alcuni geni di resistenza mutati che codificano una o più β -lattamasi. Le *Enterobacteriaceae* produttrici di β -lattamasi spesso hanno

anche resistenze ad altri antibiotici addizionali non β -lattamici, inclusi amminoglicosidi (come amikacina, gentamicina, streptomicina ecc.), fluorochinoloni (come ciprofloxacina), trimetoprim, tetracicline (come tetracicline), sulfamidici (come sulfisossazolo) e cloramfenicoli (Moawad *et al.*, 2018). Le *Enterobacteriaceae* presentano anche resistenza alla colistina, antibiotico di ultima istanza per il trattamento delle infezioni umane causate da batteri Gram-negativi multi-resistenti, in particolare ceppi resistenti ai carbapenemi nell'uomo (Barlaam *et al.*, 2019; Lay *et al.*, 2021).

1.2 La resistenza agli antibiotici: un problema globale

Dalla seconda metà del XX secolo il trattamento e la prevenzione delle malattie infettive e delle infezioni sono cambiati radicalmente grazie allo sviluppo e all'impiego degli antibiotici. L'impiego diffuso e continuo degli antibiotici ha portato alla comparsa di ceppi resistenti a tali molecole. L'utilizzo continuo degli antibiotici, infatti, ha favorito la pressione selettiva, la moltiplicazione e la diffusione dei ceppi resistenti, rendendo più difficile il trattamento delle infezioni. Nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria, che insorgono e si diffondono all'interno di ospedali e altre strutture sanitarie, sono comparsi patogeni resistenti a più classi di antibiotici contemporaneamente (multidrug resistance - MDR), (Magiorakos *et al.*, 2012) che ne rendono difficile il trattamento.

La resistenza agli antibiotici è influenzata da molteplici fattori: l'aumentato impiego e l'utilizzo improprio di questi farmaci, la diffusione di infezioni sostenute da microrganismi resistenti in ambito ospedaliero ed il limitato controllo di queste infezioni, un aumento dei viaggi internazionali che favorisce la diffusione di tali ceppi (figura 1). Già nel 2001, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) ha descritto l'AMR come un problema globale che richiede una risposta globale ((WHO. 2001).

Come si diffonde la resistenza agli antibiotici?

La resistenza agli antibiotici è la capacità dei batteri di contrastare l'azione di uno o più antibiotici. L'uomo e gli animali non sviluppano resistenza ai trattamenti antibiotici, ma i batteri trasportati dall'uomo e dagli animali possono farlo.

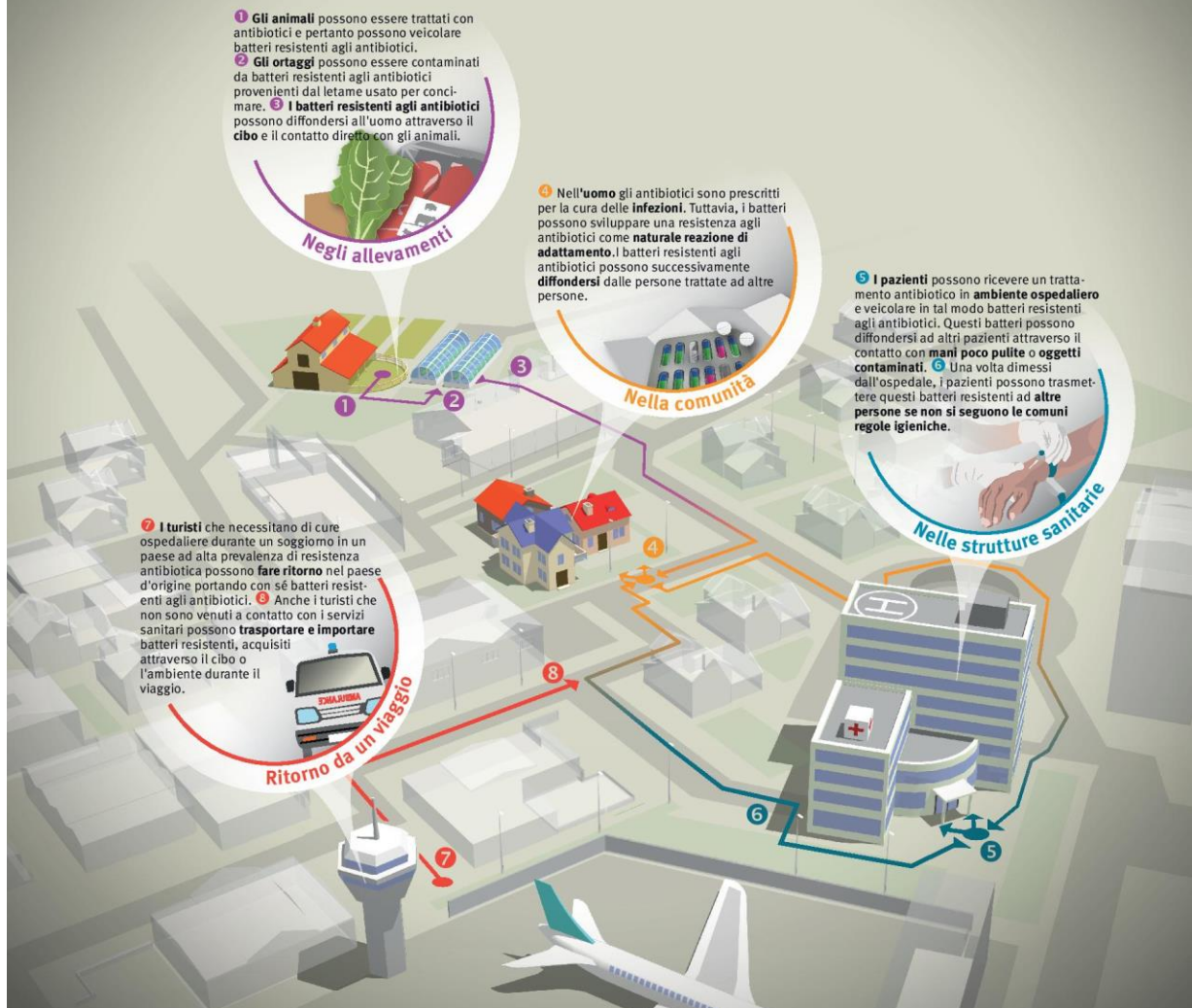


Figura 1. La resistenza antimicrobica negli allevamenti, nella comunità, nelle strutture sanitarie, nei viaggi

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". 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 *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 dagli animali all'uomo e la lotta alla resistenza agli antibiotici (European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2023) (World Health Organization, 2019; CDC, 2019).

In Italia la frequenza di isolati resistenti agli antibiotici è elevata ed è compresa tra il 25 e il 50% (figura 2).

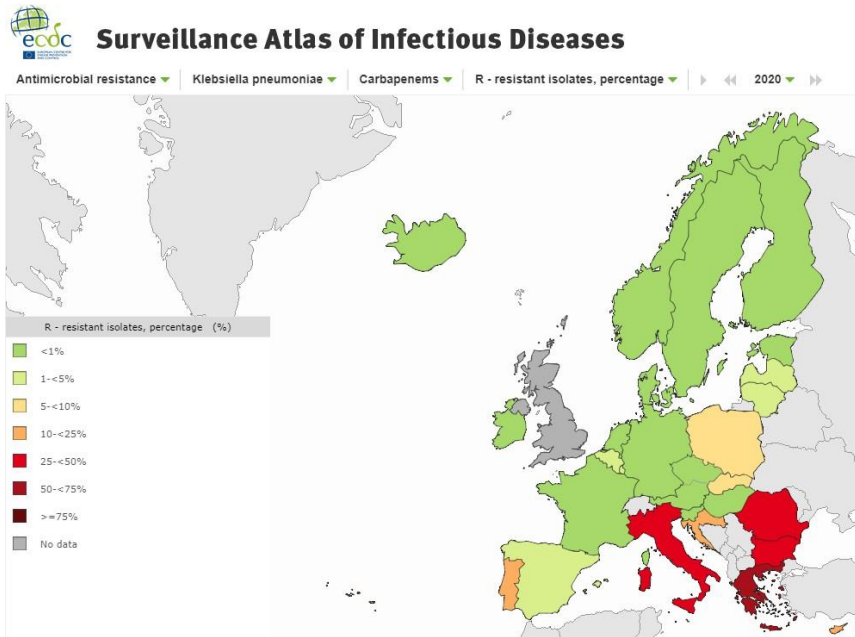


Figura 2. Dati ESAC Net/EARS Net 2020

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) 2022-2025 (Ministero della Salute "Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025") che fa seguito al precedente PNCAR 2017-2020, prorogato al dicembre 2021, che nasce con l'obiettivo di fornire le linee strategiche e le indicazioni operative per affrontare l'emergenza dell'AMR nei prossimi anni, seguendo un approccio multidisciplinare e una visione One Health, promuovendo un costante confronto in ambito internazionale e facendo al contempo tesoro dei successi e delle criticità del precedente piano nazionale e sottolinea il ruolo importante della sorveglianza epidemiologica e i cui effetti potranno essere valutati nel tempo.

1.2.1 Uso di antimicrobici nell'uomo, negli 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 and Viens, 2015); tuttavia, se da una

parte, in molte regioni del mondo, non è ancora garantito un accesso adeguato agli antibiotici ed il costo dei farmaci è spesso proibitivo (Laxminarayan *et al.*, 2013), allo stesso tempo, la metà della produzione mondiale di antibiotici viene ancora utilizzata nell'allevamento di animali da reddito e specie ittiche, contribuendo a selezionare serbatoi di batteri resistenti e ad aggravare ulteriormente il problema (Pyörälä *et al.*, 2014).

Alcune classi di sostanze antimicrobiche sono riservate più o meno esclusivamente all'uomo. Il Regolamento di esecuzione (UE) 2022/1255 della Commissione del 19 luglio 2022 designa gli antimicrobici o i gruppi di antimicrobici riservati al trattamento di determinate infezioni nell'uomo, conformemente al Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio. Il regolamento specifica che determinati antimicrobici o gruppi di antimicrobici dovrebbero essere riservati al trattamento di determinate infezioni nell'uomo, in modo da preservarne l'efficacia per la medicina umana e di sostenere la lotta contro la resistenza antimicrobica.

L'elenco degli antimicrobici comprende:

- a) Carbossipenicilline
- b) Ureidopenicilline
- c) Ceftobiprololo
- d) Ceftarolina
- e) Combinazione di cefalosporine e inibitori di beta-lattamasi
- f) Cefalosporine siderofore
- g) Carbapenemi
- h) Penemi
- i) Monobattami
- j) Derivati dell'acido fosfonico

- k) Glicopeptidi
- l) Lipopeptidi
- m) Ossazolidinoni
- n) Fidaxomicina
- o) Plazomicin
- p) Glicilciline
- q) Eravaciclina
- r) Omadaciclina

Ci sono invece, antibiotici limitati all'uso veterinario (flavofosfolipoli es. flavomicina e ionofori es. gramicidina e valinomicina), 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 *et al.*, 2015; Debarbieux *et al.*, 2016). Nell'orticoltura, per il trattamento e la profilassi delle infezioni batteriche di frutta, come mele e pere sono talvolta utilizzate le tetraciline, la streptomina e altri antimicrobici (Zinniel *et al.*, 2002). Per questo motivo, nel dicembre 2019, l'Agenzia Europea del Farmaco (EMA), su richiesta della Commissione Europea, ha emanato un documento (https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commissionupdating-scientific_en.pdf) nel quale, dal punto di vista del possibile impiego veterinario, gli antimicrobici vengono suddivisi in quattro categorie:

- A (avoidance): include gli antibiotici da non utilizzare per la terapia delle patologie animali. (antibiotici non autorizzati come medicinali veterinari nell'Unione Europea, utilizzabili solo in circostanze eccezionali e solo per la terapia individuale di animali da compagnia come i *carbapenemi* e le glicilciline come la tigeciclina);

- B (restricted): include gli antibiotici da usare solo quando gli antibiotici di categoria D e C risultano clinicamente non efficaci (antibiotici usati per trattare infezioni gravi nell'uomo come le *cefalosporine di 3^a e 4^a generazione* o la *colistina* utilizzata per infezioni causate da batteri multi-resistenti, specialmente in caso di batteri Gram-negativi);
- C (caution): include gli antibiotici da usare quando gli antibiotici di categoria D risultano clinicamente non efficaci (Esempi: macrolidi, aminoglicosidi e tetracicline);
- D (prudence): include gli antibiotici da usare come prima scelta (Esempi: penicilline semplici, sulfamidici e altri antibiotici di uso comune).

Inoltre, la WHO (World Health Organisation) ha classificato come critici (CIA, Critically Important Antimicrobials) alcuni principi attivi indispensabili per la cura di importanti infezioni umane, la cui efficacia terapeutica dev'essere preservata nel tempo. L'elenco degli antibiotici CIA è disponibile al link <https://www.who.int/foodsafety/publications/WHO-CIA-list-6flyer-EN.pdf?ua=1>) e comprende tra gli altri carbapenemi, polimixine (colistina), cefalosporine di 3^a, 4^a e 5^a generazione, fluorochinoloni e macrolidi). Alcuni paesi europei, tra cui l'Italia, hanno deciso di adottare linee guida per l'uso razionale (o "prudent use") degli antibiotici in medicina veterinaria. Tali linee guida, tra le altre azioni, suggeriscono di limitare l'utilizzo di farmaci CIA solo a quelle situazioni in cui un test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici abbia evidenziato l'inefficacia di molecole di prima scelta "non-CIA".

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 (Giguère *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 (miscelazione di animali di diversa provenienza), scarse condizioni igienico-sanitarie o altri fattori (età, stress del trasporto) (McEwen and Collignon, 2018). Ad oggi, però, il Piano Strategico Nazionale PNCAR che attua le politiche agricole comunitarie prevede di contrastare la resistenza antimicrobica, contribuendo all'obiettivo della riduzione del consumo di farmaci veterinari in allevamento.

L'utilizzo appropriato degli antibiotici rappresenta un elemento essenziale per il contrasto all'AMR. In questo contesto si pongono i programmi di *stewardship* antibiotica, ovvero quell'insieme di attività volte a promuovere l'uso appropriato di antibiotici, inclusi la scelta del farmaco, il suo dosaggio, la sua via di somministrazione e la durata della somministrazione. Tali attività, che comprendono anche il monitoraggio della prescrizione e del consumo di antibiotici e l'organizzazione di eventi formativi diretti al personale sanitario e alla popolazione generale, necessitano di essere integrate e coordinate con l'implementazione delle pratiche di prevenzione e controllo delle infezioni.

La Direzione della sanità animale e dei farmaci veterinari del Ministero della Salute ha investito in varie innovazioni, mossa dalla necessità e dall'ambizione di adeguare il sistema veterinario pubblico alle nuove sfide del settore della sanità e del benessere animale e alle esigenze dei

consumatori. Negli ultimi due anni ha implementato un sistema informatizzato, denominato *ClassyFarm*, che consente la categorizzazione dell'allevamento in base al rischio basandosi su metodi armonizzati e scientificamente validati nel rispetto della massima trasparenza a cui è tenuta l'autorità competente per l'attività di controllo ufficiale.

ClassyFarm è una innovazione tutta italiana, risultato di un progetto voluto e finanziato dal Ministero della Salute e realizzato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna con la collaborazione dell'Università di Parma. Il sistema consente di migliorare e agevolare la collaborazione ed il dialogo tra gli allevatori e l'autorità competente per elevare il livello di sicurezza e di qualità dei prodotti della filiera agroalimentare, rafforzare la prevenzione delle malattie animali e la lotta all'antimicrobico-resistenza e rendere più efficiente il controllo ufficiale da parte delle Autorità competenti. Allo stesso tempo offre agli allevatori le condizioni per migliorarsi e tendere all'eccellenza.

In particolare, *ClassyFarm* permette la rilevazione e l'elaborazione dei dati relativi alle seguenti aree di valutazione: biosicurezza; benessere animale; parametri sanitari e produttivi; alimentazione animale; consumo di farmaci antimicrobici; lesioni rilevate al macello.

Tutte misure atte a ridurre il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, che ha assunto dimensioni drammatiche tali da rendere indispensabile e non procrastinabile una programmazione degli interventi preventivi.

1.2.2 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 and Gunter, 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).

Gli Enterobatteri, frequenti nell'ambiente e negli alimenti, sono segnalati come agenti patogeni opportunisti in piante, animali e uomini e spesso sono associati al fenomeno della Multiple Drug Resistance (MDR). Diversi studi hanno dimostrato che gli alimenti sia di origine animale che di origine vegetale possono essere veicolo di batteri MDR (Ojer-Usoz *et al.*, 2017; Muloi *et al.*, 2018a; Bourdichon *et al.*, 2021; Vitas *et al.*, 2018). La circolazione di tali ceppi negli animali e nei loro prodotti rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana (Muloi *et al.*, 2018b), soprattutto in considerazione del fatto che i geni che codificano per tali determinanti di resistenza sono spesso associati a elementi genetici mobili che possono essere trasferiti a batteri sia commensali sia patogeni, anche di altri generi e specie.

Secondo l'ECDC, ogni anno oltre 670.000 infezioni si verificano nell'UE a causa di batteri resistenti agli antibiotici e circa 33000 persone muoiono come diretta conseguenza di questi tipi di infezione (European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2023). Le infezioni sostenute da batteri altamente resistenti non si limitano più alle sole ICA (Infezioni Correlate all'Assistenza) acquisite in ambito ospedaliero, dove la trasmissione di agenti patogeni avviene principalmente da persona infetta/colonizzata ad altre persone. Oggi, attraverso gli alimenti contaminati, i batteri AMR si

diffondono, non solo ai gruppi ad alto rischio, come pazienti immunodepressi o vulnerabili, ma a tutta la popolazione (Pérez-Rodríguez and Mercanoglu Taban, 2019).

2. MECCANISMI DELLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca (naturale) o acquisita. Nel primo caso si parla di mancata suscettibilità ed è una caratteristica di alcune specie batteriche i cui membri sono tutti resistenti a un particolare farmaco, o perché mancano del meccanismo cellulare verso il quale il composto esercita la propria azione o la loro parete cellulare è impermeabile al farmaco stesso. Nel secondo caso invece, la resistenza origina da mutazioni cromosomiche o dall'acquisizione di materiale genetico trasferibile già presente in popolazioni batteriche correlate o meno a quella ricevente.

Gli enterobatteri hanno una resistenza intrinseca a molte classi di antibiotici con alcune differenze tra le varie specie per quanto riguarda il profilo di sensibilità naturale (CLSI, 2010), ed hanno mostrato una notevole capacità ad evolvere resistenze acquisite nei confronti degli antibiotici che funzionano sui ceppi wild-type. L'accumulo progressivo di determinanti di resistenza ha portato all'emergenza progressiva di ceppi con fenotipi di multiresistenza (ceppi MDR), con il tempo questi "super batteri" possono diventare resistenti anche a tutti gli antibiotici disponibili e sono definiti batteri pan-resistenti. La specie maggiormente interessata dal problema delle multi-resistenze estese è *Klebsiella pneumoniae*, ma il fenomeno interessa anche molte altre specie di comune isolamento clinico.

I meccanismi di azione degli antimicrobici sono cinque (Nathwani *et al.*, 2014):

- inibizione della sintesi della parete cellulare (agenti battericidi);
- alterazione delle subunità ribosomiali 30s e 50s, che risulta in una sospensione o modificazione della sintesi proteica (agenti batteriostatici);

- legame del farmaco alla subunità 30s e conseguente inibizione o alterazione della sintesi proteica (agenti battericidi);
- modificazione del metabolismo degli acidi nucleici (agenti battericidi);
- azione sul metabolismo generale del germe (agenti batteriostatici, ma che possono diventare battericidi in alcune circostanze).

Inoltre, alcuni nuovi composti interferiscono con il potenziale elettrico della cellula, portando alla sua depolarizzazione e morte (Steenbergen *et al.*, 2005).

In figura 3 è indicato il meccanismo di azione di varie classi di antibiotici e i meccanismi di resistenza agli antimicrobici messi in atto dai batteri.

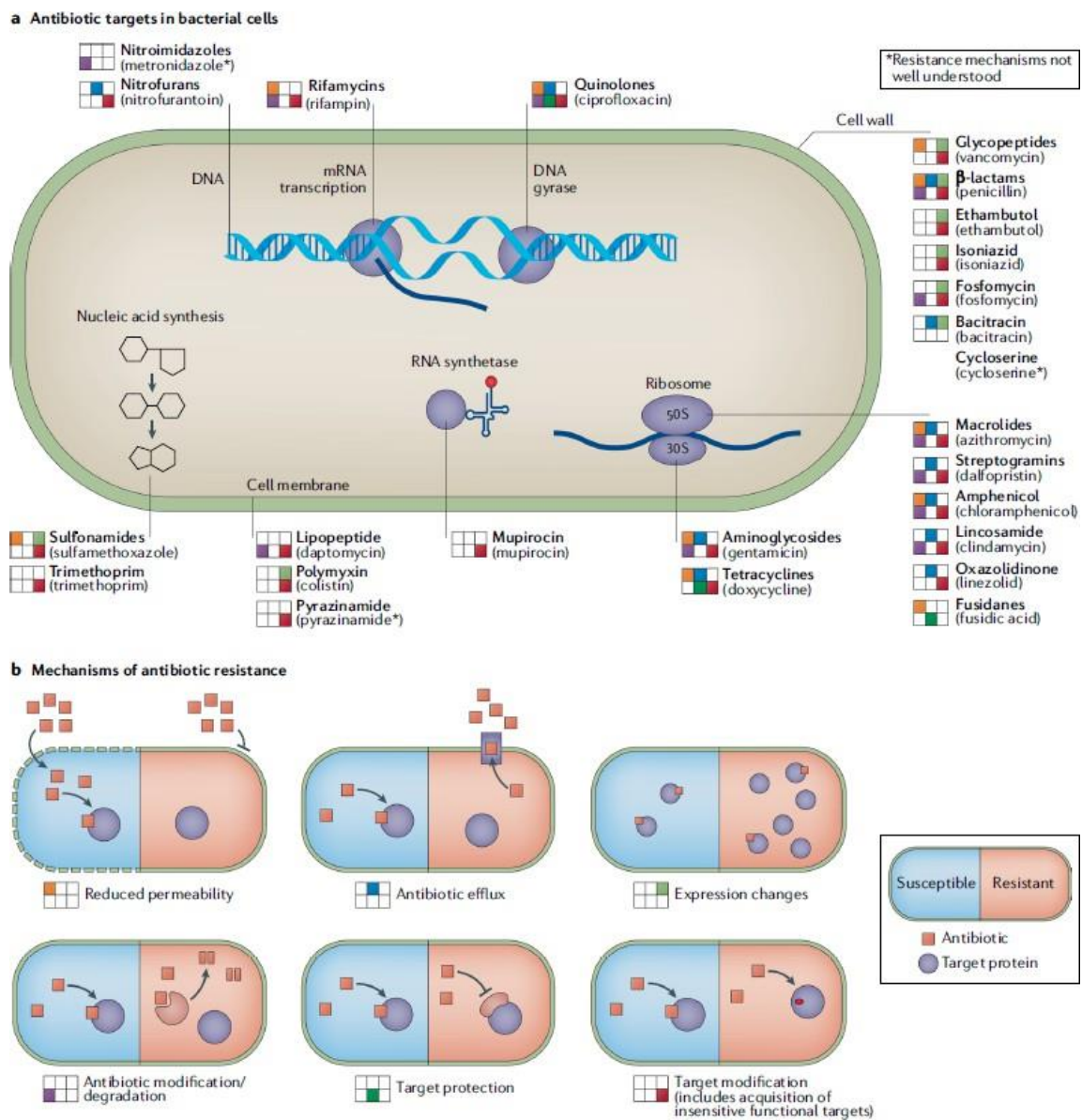


Figura 3. Meccanismi di azione delle varie classi di antibiotici. Gli antimicrobici sono raggruppati in base al sito bersaglio. Le classi di farmaci sono in grassetto e i farmaci di esempio di quella classe sono tra parentesi sotto le classi di farmaci. I meccanismi di resistenza antimicrobica che agiscono su quella classe sono raffigurati a sinistra della classe antimicrobica secondo il layout mostrato nella parte b.

I più importanti meccanismi di resistenza ai farmaci (figure 3b e 4) (Santajit and Indrawattana, 2016) sono:

Inattivazione o alterazione del farmaco (Antibiotic modification/degradation; Expression changes). Molti batteri producono enzimi che modificano e inattivano irreversibilmente gli antibiotici, come le beta-lattamasi, che agiscono idrolizzando l'anello β -lattamico indispensabile per l'attività di penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi (Tang *et al.*, 2014).

Modifica del sito target dell'antibiotico (Target protection; Target modification). 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 (Tang *et al.*, 2014).

Cambiamenti nella permeabilità della membrana cellulare con conseguente riduzione dell'accumulo di farmaci a livello intracellulare (Reduced permeability; Antibiotic efflux). 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 (Blair *et al.*, 2015).

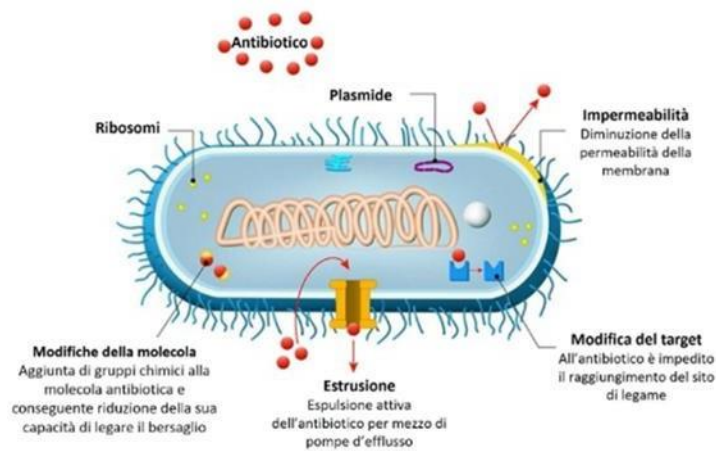


Figura 4. Meccanismi di resistenza ai farmaci messi in atto dai batteri

I geni implicati nella resistenza agli antimicrobici possono trovarsi sul cromosoma batterico, su plasmidi o essere mediati da trasposoni (Giedraitienė et al., 2011).

La mutazione cromosomica produce proteine che differiscono da quelle originali in maniera sufficiente a interferire con l'attività degli antibiotici. La loro diffusione avviene durante la moltiplicazione batterica (trasferimento verticale). La resistenza cromosomica risulta utile ai germi solo quando gli antibiotici vengono usati, costituendo un mezzo di selezione naturale nei confronti dei ceppi sensibili e il suo sviluppo è un processo graduale, di solito dovuto a diverse mutazioni successive. I mutanti resistenti emergono con maggior frequenza in vitro piuttosto che in vivo, probabilmente perché le mutazioni di questo tipo sono associate ad altre modificazioni cellulari svantaggiose per i batteri, tanto che generalmente il numero di mutanti diminuisce in seguito alla sospensione del trattamento. Per questo motivo il fenomeno della resistenza cromosomica è ritenuto di minor importanza rispetto a quello della resistenza trasferibile.

Nella mutazione trasferibile certi geni batterici sono in grado di spostarsi tra DNA cromosomiale ed extra-cromosomiale, tra batteri della stessa specie, o di specie e generi diversi (trasferimento orizzontale). I veicoli più importanti di questo movimento di geni sono: plasmidi, trasposoni e integroni. In virtù della loro mobilità tali elementi hanno maggiore possibilità di persistere anche in assenza di pressione selettiva da parte degli antibiotici, rispetto alla resistenza cromosomica.

I plasmidi sono molecole circolari di DNA extra-cromosomiale in grado di replicare in maniera autonoma, indipendentemente dal cromosoma batterico e trasportano geni importanti per la riproduzione del batterio, il suo metabolismo, la resistenza ad antibiotici e virus batteriofagi, sebbene non siano necessari alla sopravvivenza del germe se non in particolari condizioni.

Un integrone è una sequenza di DNA che permette l'inserzione di alcuni elementi trasponibili (che si spostano). L'integrone è in grado di intrappolare dei geni mobili inattivi, detti cassette geniche, ed esprimerli, rendendoli funzionali. Le cassette geniche si trovano nel citoplasma anche come elementi circolari, ma non sono in grado di esprimere i propri geni senza integrarsi nel genoma batterico, perché in genere sono sequenze prive di promotore.

I trasposoni (geni saltatori) sono delle corte sequenze di DNA che possono spostarsi da un plasmide a un altro, tra plasmidi e cromosoma batterico o tra plasmidi e batteriofagi (virus batterici), ma non sono in grado di replicarsi in maniera autonoma. Le sequenze IS (insertion sequences) costituiscono il modello più semplice di trasposone; tali elementi sono rappresentati da porzioni di DNA della lunghezza massima di 2kb codificanti l'enzima trasposasi, necessario per lo spostamento da una posizione a un'altra del DNA. Alle estremità delle IS di solito ci sono delle corte sequenze ripetute e invertite di circa venti nucleotidi importanti per la

localizzazione e l'inserimento nel DNA target. I plasmidi acquisiscono facilmente trasposoni e spesso alcuni di questi vengono raggruppati all'interno dello stesso plasmide, conferendo determinanti di resistenza multipla con un singolo processo di coniugazione. Tali spostamenti genetici consentono uno sviluppo rapido di resistenza in diverse popolazioni batteriche (Alibayov *et al.*, 2014).

I meccanismi che consentono il trasferimento orizzontale sono la trasduzione, la trasformazione e la coniugazione (Kurland *et al.*, 2003). Nella trasduzione, il vettore è un batteriofago che trasferisce un frammento di DNA da un batterio a un altro. È noto che i batteriofagi contribuiscono alla diffusione dei geni AMR tra patogeni trasmessi dagli alimenti come *Salmonella* o *Escherichia coli* (Colavecchio *et al.*, 2017). La trasformazione consente l'acquisizione e l'incorporazione di DNA esogeno. Quando i batteri muoiono e la loro membrana è stata più o meno distrutta, rilasciano frammenti di DNA che possono essere raccolti da altri batteri. La coniugazione è un processo durante il quale il DNA viene trasferito da un batterio donatore a un batterio recettore attraverso un meccanismo che prevede uno stretto contatto cellulare.

3. ANTIBIOTICI β -lattamici

I β -lattamici sono una classe molto ampia di antibiotici (figura 5) 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.

Antimicrobial Class	Antimicrobial Subclasses		Agents Included; Generic Names	
Penicillins:	Penicillinase-labile penicillins ^a	Penicillin	Penicillin	
		Aminopenicillins	Amoxicillin Ampicillin	
		Carboxypenicillins	Carbenicillin Ticarcillin	
		Ureidopenicillins	Azlocillin Piperacillin	
	Penicillinase-stable penicillins ^b		Cloxacillin Dicloxacillin Nafcillin Oxacillin	
	Amdinocillin		Mecillinam	
B-lactam combination agents:			Amoxicillin-clavulanate Ampicillin-sulbactam Aztreonam-avibactam Aztreonam-nacubactam (1:1) Cefepime-enmetazobactam (4:1) Cefepime-nacubactam (1:1) Cefepime-taniborbactam Cefepime-tazobactam (1:1) Cefepime-zidebactam Ceftaroline-avibactam Ceftazidime-avibactam Ceftibuten-avibactam Ceftibuten-ledorbactam Ceftolozane-tazobactam Imipenem-relebactam Meropenem-nacubactam (1:1) Meropenem-vaborbactam Meropenem-xeruborbactam Piperacillin-tazobactam Sulbactam-durlobactam Ticarcillin-clavulanate	
Antimicrobial Class	Antimicrobial Subclasses		Agents Included; Generic Names	
Cephems (parenteral)	Cephalosporins I ^c		Cefazolin Cephalothin Cephapirin Cephradine	
		Cephalosporins II ^c	Cefamandole Cefonicid Cefuroxime (parenteral)	
	Cephalosporins III ^c		Cefoperazone Cefotaxime Ceftazidime Ceftizoxime Ceftriaxone	
		Cephalosporins IV ^c	Cefepime Cefpirome	
		Cephalosporins with anti-MRSA activity	Ceftaroline Ceftobiprole	
	Cephamycins		Cefmetazole Cefotetan Cefoxitin	
	Oxacephem		Moxalactam	
	Siderophore cephalosporin		Cefiderocol	
	Cephems (oral)	Cephalosporins		Cefaclor Cefadroxil Cefdinir Cefditoren Cefetamet Cefixime Cefpodoxime Cefprozil Ceftibuten Cefuroxime (oral) Cephalexin Cephradine
			Carbacephem	Loracarbef
Monobactams			Aztreonam	
Penems	Carbapenems		Biapenem Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem Razupenem Tebipenem	
		Penems	Faropenem Sulopenem	

Figura 5. Antibiotici beta-lattamici (Glossary I in CLSI M100 Ed.33th 2023)

Tutti gli antibiotici di questa classe presentano un nucleo funzionale principale, un'ammide ciclica nota come anello beta-lattamico, conosciuto anche più semplicemente come β -lattame (Figura 6) è un anello a 4 atomi, che può trovarsi come unico costituente della molecola come nei **monobattami** oppure associato ad un anello a 5 atomi contenente un atomo di S (gruppo penam) come nelle **penicilline** (primi antimicrobici ad essere stati scoperti (Bennett and Chung, 2001), o ad un anello insaturo a 6 atomi, con un atomo di S (cefem) come nelle **cefalosporine** o ad un anello a 5 atomi, con un doppio legame (carbapenemici, oxapenem etc) come nei **carbapenemi**.

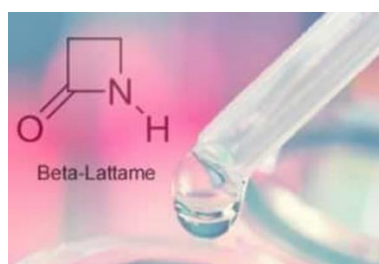


Figura 6. Anello β -lattame

I β -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 *et al.*, 2014). Il blocco viene realizzato attraverso l'interazione irreversibile tra l'antibiotico e una serina presente nel sito attivo dell'enzima. Il β -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 β -lattamica. La parete risulta indebolita e la cellula batterica diventa suscettibile alla lisi. Le perturbazioni indotte dai β -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 β -lattamasi, capaci di idrolizzare l'anello β -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 *et al.*, 2019).

3.1 β -lattamasi

Per la loro efficacia e tollerabilità gli antibiotici β -lattamici sono tra i più utilizzati per la terapia delle infezioni da enterobatteri sia in ambito ospedaliero sia in ambito comunitario. La produzione di β -lattamasi, enzimi che degradano l'anello β -lattamico rendendo il farmaco inattivo, rappresenta il principale meccanismo di resistenza ai β -lattamici negli enterobatteri anche se altri meccanismi (es. ridotta permeabilità della membrana esterna per alterazione delle porine) possono contribuire variabilmente.

Alcune beta-lattamasi sono codificate su elementi genetici mobili (es., i plasmidi); altre sono codificate su cromosomi. La produzione di beta-lattamasi è tra i meccanismi di resistenza clinicamente più importanti per i patogeni batterici Gram-negativi.

Ci sono migliaia di tipi diversi di beta-lattamasi; esistono molteplici schemi di classificazione, ma lo schema di classificazione di Ambler è il più utilizzato. Esso raggruppa le beta-lattamasi per classe sulla base dell'omologia molecolare. Le classi A, C e D hanno un residuo di serina nel sito attivo, mentre gli enzimi di classe B hanno zinco nel sito attivo, ossia, le metallo-beta-lattamasi. La classe A comprende le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBLs) e le carbapenemasi di *Klebsiella pneumoniae*, la classe B comprende le metallo-beta-lattamasi (NDM, Imp, e VIM), la classe C comprende le AmpC, e la classe D comprende le oxacillinasi (OXA). Attualmente, gli enzimi più importanti dal punto di vista clinico, per epidemiologia e implicazioni di resistenza, sono le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), le β -lattamasi di tipo AmpC, e le carbapenemasi.

3.1.1 β -lattamasi a spettro esteso (ESBL-Extended Spectrum β -lattamasi)

Le beta-lattamasi a spettro esteso (Extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs), tra cui gli enzimi TEM, SHV, CTX-M e GES, sono enzimi codificati nei plasmidi che si trovano principalmente in *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, e altri Enterobacterales. Le ESBL sono capaci di degradare le penicilline, le cefalosporine (comprese quelle di terza e quarta generazione e quelle con attività anti MRSA) e i monobattami, ma non i carbapenemi. Le ESBL sono generalmente sensibili agli inibitori convenzionali (e.g. clavulanato, sulbactam, tazobactam) e a quelli di nuova generazione (e.g. diazabiccioottani, boronati), ed i ceppi produttori di ESBL sono spesso sensibili alle combinazioni β -lattamico + inibitore (BLIC) (Bonomo, 2017).

Le β -lattamasi a spettro esteso subiscono una mutazione nel gene di origine, che porta ad ottenere uno spettro più ampio di resistenza. Questa mutazione permette al ceppo batterico di

acquisire una multi-resistenza che si riflette in campo medico nella difficoltà di prescrivere una terapia antibiotica idonea.

Le ESBL hanno iniziato a diffondersi tra gli enterobatteri a partire dalla metà degli anni '80 del secolo scorso, in risposta alla pressione selettiva generata dall'uso estensivo di cefalosporine di terza generazione, e sono andate rapidamente incontro ad una diffusione globale, facilitata dal fatto di essere mediate da plasmidi trasferibili tra gli enterobatteri. Inizialmente rappresentate da mutanti puntiformi delle β -lattamasi ad ampio spettro di tipo TEM e SHV, già largamente prevalenti in ambito clinico, le ESBL hanno successivamente presentato una evoluzione epidemiologica caratterizzata dalla comparsa di nuovi tipi di enzimi, tra i quali i più importanti sono quelli di tipo CTX-M (in grado di indurre una resistenza anche ad antibiotici quali chinoloni, aminoglicosidi e trimetoprim che non rientrano nella famiglia dei β -lattamici, che in poco tempo hanno largamente rimpiazzato le altre varianti e raggiunto prevalenze anche molto elevate in molti contesti epidemiologici (Rossolini and Docquier, 2006; Bevan *et al.*, 2017), ma anche nuove β -lattamasi ad esempio PER, GES, VEB (Tooke *et al.*, 2019).

3.1.2 β -lattamasi AmpC

Si presenta come un gruppo di β -lattamasi con geni che possono essere localizzati sul cromosoma o sul plasmidio. Gli enzimi AmpC idrolizzano le penicilline, la maggior parte delle cefalosporine (eccetto il cefepime), cefamicine (p. es., cefoxitina, cefotetan), monobattami (p. es., aztreonam). La loro particolarità consiste nel fatto che non vengono inibite dall'acido clavulanico (Eckburg *et al.*, 2019). Vengono, però inibite dalla cloxacillina. Appartengono alla classe C della classificazione di Amber. La beta-lattamasi AmpC può essere codificata nei cromosomi o nei plasmidi. L'espressione cromosomica delle AmpC può essere indotta da alcuni

antibatterici o può essere espressa costitutivamente (ossia, iperprodotta) in mutanti de-repressi. L'espressione di AmpC codificata nei plasmidi è anche costitutiva e può essere diffusa tra i batteri di solito privi di questa beta-lattamasi, come *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Proteus mirabilis*.

Gli isolati con espressione di AmpC inducibile possono inizialmente risultare sensibili alle cefalosporine di 3a generazione, che possono complicare le decisioni di trattamento, specialmente per gli Enterobacterales. *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, e *Citrobacter freundii* devono essere considerati come portatori di AmpC inducibile, e le cefalosporine di 3a generazione devono essere evitate indipendentemente dai risultati di suscettibilità. *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Providencia* spp. possono produrre enzimi AmpC in eccesso, ma un'espressione clinicamente significativa è meno frequente (Spratt, 1975).

Nota: I geni possono essere di due tipi: geni costitutivi (housekeeping), sempre espressi, come gli enzimi della glicolisi; geni inducibili, espressi in certe condizioni, per stimoli intra- o extracellulari (fattori di trascrizione)

3.1.3 β -lattamasi Carbapenemasi

Tra i diversi β -lattamici, i carbapenemi possiedono il più ampio spettro antibatterico in vitro, non solo tra i β -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 *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.

Negli enterobatteri, la resistenza acquisita ai carbapenemi è rimasta rara per molto tempo, ma negli ultimi anni ha iniziato a diffondersi in modo consistente, e l'emergenza degli enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE) è considerata uno dei più importanti problemi di antibiotico-resistenza presentatisi negli ultimi anni. Negli enterobatteri la resistenza ai carbapenemi può essere mediata da una ridotta permeabilità della membrana esterna per perdita di porine in associazione con la produzione di beta-lattamasi di tipo ESBL o AmpC, oppure da una produzione di β -lattamasi capaci di degradare efficientemente i carbapenemi, le carbapenemasi. La produzione di carbapenemasi rappresenta il principale meccanismo di resistenza acquisita ai carbapenemi negli enterobatteri, ed è anche quello di maggiore rilevanza epidemiologica dal momento che sono mediate da plasmidi trasferibili che possono diffondersi rapidamente tra gli enterobatteri (Nordmann *et al.*, 2012).

Le principali carbapenemasi emerse negli enterobatteri sono gli enzimi di tipo KPC (carbapenemasi a serina, di classe molecolare A), gli enzimi OXA-48-like (carbapenemasi a serina, di classe molecolare D) e le metallo- β -lattamasi (carbapenemasi a zinco, di classe molecolare B) che a loro volta comprendono gli enzimi di tipo VIM, NDM ed IMP. Si tratta di enzimi che, oltre a degradare i carbapenemi, sono attivi anche sulla maggioranza degli altri composti β -lattamici e quindi in grado di conferire un fenotipo di resistenza ai β -lattamici molto ampio, che generalmente copre penicilline, cefalosporine e carbapenemi. Inoltre, le carbapenemasi non sono inibite dagli inibitori delle β -lattamasi di derivazione β -lattamica (clavulanato, sulbactam e tazobactam) e solo alcune di esse sono inibite dai nuovi inibitori di

natura non β -lattamica. In particolare, gli enzimi di tipo KPC sono inibiti da avibactam, relebactam e vaborbactam, mentre gli enzimi di tipo OXA-48 solo da avibactam e i metallo-enzimi da nessuno di questi nuovi inibitori.

Le varie carbapenemasi presentano caratteristiche funzionali diverse in termini di spettro di attività e sensibilità agli inibitori, che sono riassunte nella Tabella 1, e anche una diversa distribuzione epidemiologica (Grundmann *et al.*, 2017). In Italia la specie batterica maggiormente interessata dalla diffusione di carbapenemasi è la *K. pneumoniae*, e le carbapenemasi più frequenti sono quelle di tipo KPC, che rappresentano oltre il 90% degli isolati produttori di carbapenemasi (Conte *et al.*, 2016; Giani *et al.*, 2017).

Tabella 1 - Caratteristiche differenziali delle principali carbapenemasi diffuse nei ceppi di enterobatteri resistenti ai carbapenemi.

	Tipo di carbapenemasi		
	KPC	OXA-48-like	Metallo-enzimi (VIM, NDM, IMP)
Attività carbapenemastica	Forte	Debole	Forte
Spettro di attività	Tutti i β -lattamici	Penicilline, cefalosporine a spettro ristretto, carbapenemi	Tutti i β -lattamici ad eccezione di aztreonam (e piperacillina per IMP)
Sensibilità ad inibitori	Boronati (e. g. vaborbactam), Diazabicicloottani (e. g. avibactam, relebactam)	Avibactam	EDTA

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

La colistina agisce principalmente sulla superficie della membrana cellulare batterica. 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. L'effetto della colistina sulla membrana batterica può essere antagonizzato con alti livelli di cationi bivalenti (Karaïskos *et al.*, 2017). 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 *et al.*, 2012).

4.1 La resistenza alla colistina

La colistina è stata recentemente recuperata come farmaco *last-resort* per le infezioni da batteri Gram-negativi multi-resistenti, compresi i CRE e in particolare i ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi. L'incremento nell'uso della colistina in ambito clinico ha portato rapidamente alla selezione di ceppi colistino-resistenti, specialmente in *K. pneumoniae*. Secondo i dati riportati in un'indagine condotta in Italia nell'ambito della sorveglianza europea EuSCAPE, più del 40% dei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi erano anche resistenti alla colistina, e due ceppi erano pan-resistenti. Questo vuol dire che per il trattamento

delle infezioni da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi rimangono pochissimi o addirittura nessun antibiotico efficace.

Il principale meccanismo di resistenza alla colistina negli enterobatteri è rappresentato da una modificazione del bersaglio del farmaco, il lipide A del lipopolisaccaride batterico (LPS) per l'aggiunta di residui di fosfoetanolamina o di aminodeossiarabinoso che ne neutralizzano la carica negativa riducendo l'affinità per la colistina. Tale modificazione può essere operata dai sistemi endogeni di modificazione dell'LPS in seguito a mutazioni cromosomiche che attivano questi sistemi, oppure da enzimi con attività fosfoetanolamina trasferasica codificati da plasmidi trasferibili (enzimi *mcr*) (Poirel and Nordmann, 2016). Le mutazioni cromosomiche responsabili della resistenza alla colistina possono interessare numerosi geni regolatori. Gli enzimi di tipo *mcr*, trasportati dai plasmidi, sono stati scoperti solo recentemente (Liu *et al.*, 2016) in isolati di enterobatteri (prevalentemente *E. coli* e *Salmonella*, ma anche altre specie) di origine animale ma anche umana ed ambientale. Da allora, altre varianti *mcr*, tra cui *mcr-2* (Xavier *et al.*, 2016), *mcr-3* (Yin *et al.*, 2017), *mcr-4* (Carattoli *et al.*, 2017), *mcr-5* (Borowiak *et al.*, 2017), *mcr-6* (AbuOun *et al.*, 2018), *mcr-7* (Yang *et al.*, 2018), *mcr-8* (Wang *et al.*, 2018), *mcr-9* (Carroll *et al.*, 2019) e *mcr-10* (Wang *et al.*, 2020) sono state identificate in varie specie di *Enterobacteriaceae*. Questi geni *mcr* sono stati rilevati in *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii* e ceppi di *Raoultella ornithinolytica* isolati da cibo, ambiente, animali ed esseri umani (Schwarz and Johnson, 2016). La resistenza alla colistina determinata da questo gene *mcr*, collocato su plasmide, e quindi trasferibile da batterio a batterio, anche tra specie diverse, è potenzialmente più diffusibile. La selezione e diffusione dei plasmidi codificanti per questi enzimi si ritiene sia

stata promossa dall'uso estensivo della colistina in ambito veterinario (Schwarz and Johnson, 2016; Sun *et al.*, 2018). La possibilità di trasferimento di questi determinanti di resistenza in ambito clinico ha generato molta preoccupazione in considerazione del ruolo della colistina come farmaco *last-resort* per la terapia delle infezioni da CRE. Al momento la diffusione di resistenze trasferibili alla colistina in ambito clinico resta limitata, e interessa soprattutto *E. coli* (Poirel and Nordmann, 2016), ma la sorveglianza del fenomeno riveste evidentemente una notevole importanza.

5. SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente lavoro è stato valutare la diffusione, negli alimenti di origine animale e vegetale, di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* che mostravano resistenza alla colistina e ai Beta-lattamici mediante produzione di enzimi ESBL o carbapenemasi. I ceppi isolati sono stati caratterizzati mediante sequenziamento del genoma, al fine di evidenziare la presenza dei geni che conferiscono la resistenza ai farmaci antibiotici e individuare i geni dei fattori di virulenza e la presenza di plasmidi ovvero elementi mobili in grado di trasferire tali geni da un batterio ad un altro anche appartenenti a specie diverse.

Il lavoro si è diviso in una prima parte in cui è stato standardizzato:

- un protocollo microbiologico tramite l'uso di vari terreni cromogeni per l'isolamento di Enterobatteri produttori di ESBL, e/o resistenti alla colistina, e/o ai carbapenemi da matrici alimentari di origine animale e vegetale;
- un protocollo per confermare la produzione di ESBL mediante il test di combinazione secondo le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute);
- un protocollo per confermare la resistenza alla colistina mediante il test della Minima Concentrazione Inibente (MIC) secondo le CLSI;
- un protocollo per la conferma della resistenza ai carbapenemi e alla produzione di carbapenemasi, mediante il test di sinergia secondo EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Una seconda parte in cui sono stati applicati i metodi, studiati nella prima fase, ai campioni da analizzare.

Sono stati analizzati alimenti di origine animale e vegetale sia pronti al consumo (ready to eat), sia alimenti da sottoporre a cottura prima della consumazione (crudi), prelevati in Puglia e Basilicata, ai fini dell'isolamento di Enterobatteri produttori di ESBL, e/o resistenti alla colistina, e/o ai carbapenemi, mediante l'uso dei terreni colturali cromogeni selezionati della prima fase del lavoro.

I ceppi batterici isolati sono stati sottoposti ad una prima identificazione mediante la tecnica della spettrometria di massa MALDI-TOF. I ceppi di interesse sono stati sottoposti ai test di conferma in base al terreno da cui erano stati isolati:

- test di combinazione per gli isolati da terreno selettivo per produttori di ESBL;
- test di sinergia per gli isolati da terreno selettivo per batteri resistenti ai carbapenemi;
- test MIC per colistina per gli isolati da terreno selettivo per la resistenza alla colistina.

Gli isolati che sono risultati resistenti alla colistina e/o produttori di ESBL e/o resistenti ai carbapenemi sono stati sottoposti al test dell'antibiotico-sensibilità, mediante metodo della minima concentrazione inibente (MIC), per ulteriori classi di antibiotici.

Tutti gli isolati con fenotipo resistente sono stati poi sottoposti al sequenziamento dell'intero genoma (wgs) per evidenziare la presenza di marcatori genetici specifici di AMR (antimicrobico-resistenza), determinanti plasmidici e geni della virulenza.

6. METODICHE UTILIZZATE

6.1 Terreni di coltura selettivi e differenziali

Nel presente lavoro, sono stati utilizzati tre terreni selettivi e differenziali.

I terreni selettivi contengono agenti che permettono a specifici batteri di crescere, ma che inibiscono la crescita di altri. Gli agenti inibitori potrebbero essere farmaci antimicrobici, coloranti o alcoli. I terreni differenziali permettono di distinguere diversi tipi di batteri in base all'aspetto della coltura. In quanto contengono uno o più fattori che fanno sì che i batteri con specifiche caratteristiche metaboliche o di coltura abbiano un aspetto diverso dagli altri batteri che crescono sulla stessa piastra di agar. In risposta ai componenti del terreno, le colonie batteriche potrebbero cambiare colore o influenzare l'aspetto del terreno attraverso la produzione di enzimi extracellulari.

I terreni selezionati per l'isolamento di Enterobatteri oggetto del nostro studio sono i seguenti: CHROMagar™ESBL, CHROMagar™COL-APSE e CHROMagar™mSuperCARBA (CHROMagar, Paris, France).

Sono terreni di coltura cromogeni selettivi e differenziali (grazie alla presenza di substrati in grado di dare colorazioni differenti a seconda della specie batterica che li metabolizza). Destinati alla rilevazione qualitativa diretta di Enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) il CHROMagar™ ESBL, di Enterobatteri resistenti alla colistina il CHROMagar™COL-APSE e di batteri resistenti ai carbapenemi il CHROMagar™mSuperCARBA.

In particolare, CHROMagar™ ESBL consente di rilevare i batteri produttori di ESBL inibendo la crescita di altri batteri, compresa la maggior parte di quelli portatori di resistenza di tipo

AmpC. Questa è una caratteristica importante perché la resistenza intrinseca all'AmpC ha minore rilevanza epidemica, ma spesso porta a letture false positive dell'ESBL nei metodi di test classici.

CHROMagar™ COL-APSE è un terreno di coltura cromogeno selettivo e differenziale, sensibile e specifico per la crescita di patogeni batterici resistenti alla colistina. Questo nuovo terreno può essere utile come terreno di isolamento primario nella sorveglianza e nel recupero di batteri resistenti alla colistina da campioni umani, veterinari e ambientali complessi, in particolare quelli con *mcr* mediato da plasmidi o nuovi meccanismi di resistenza alla polimixina.

CHROMagar™ mSuperCARBA™ è un terreno di coltura cromogeno selettivo e differenziale, destinato alla rilevazione qualitativa diretta di Enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE), compresi i produttori di OXA-48.

La colorazione specifica (figura 8) dei principali batteri in grado di crescere su questi tre terreni è la seguente: *Escherichia coli* colorazione da rosa a bordeaux (produttrici di β -glucuronidasi); *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* colorazione da verde/blu a marrone-verde (produttrici di β -glucuronidasi); *Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Moraganella*) colorazione da marrone scuro a marrone (ceppi che esprimono deaminasi).

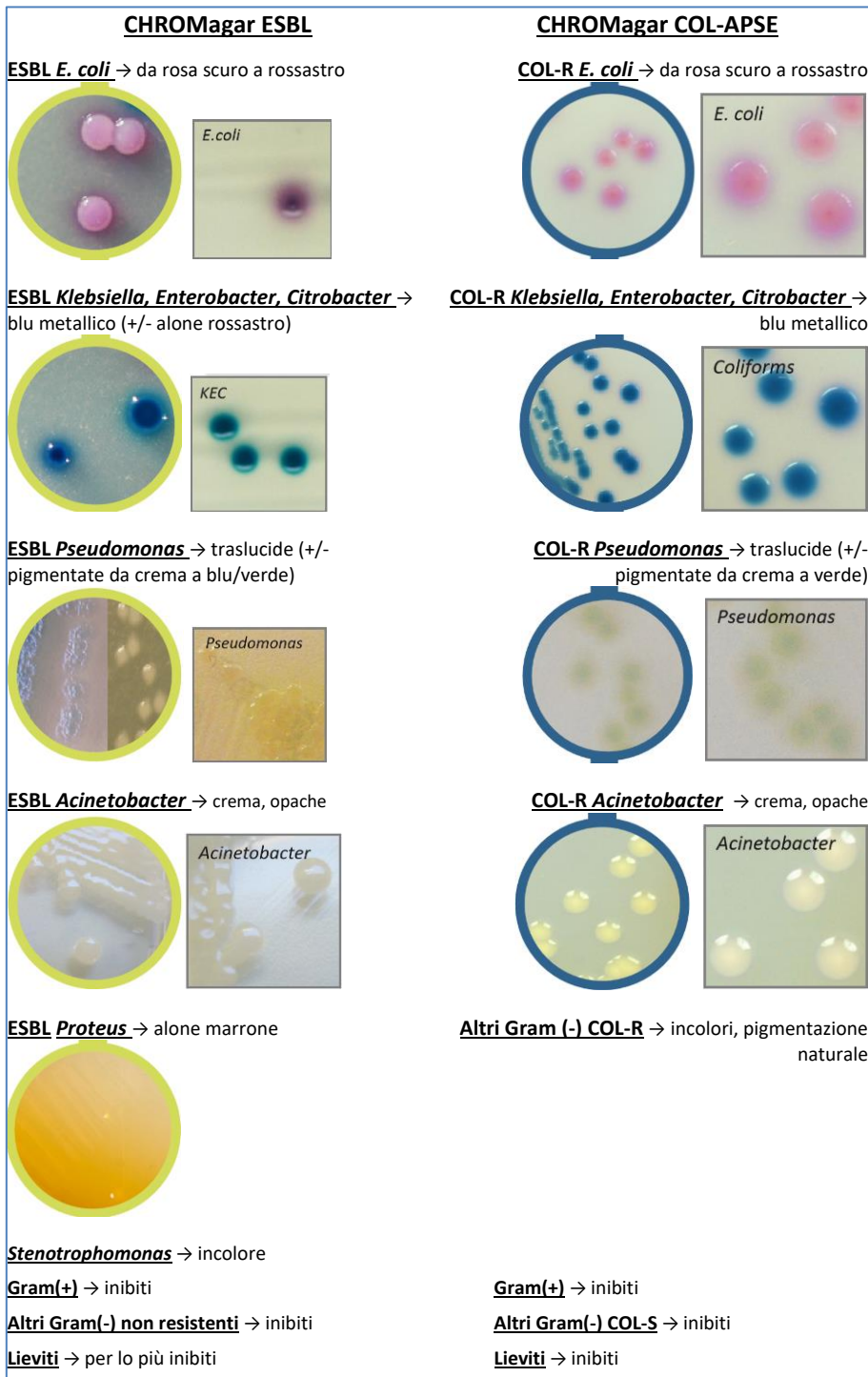


Figura 8. Aspetto dei principali Enterobatteri e batteri Gram negativi sui terreni CHROMagar™ ESBL e CHROMagar™ COL- APSE

6.2 Test di sensibilità agli antibiotici

L'antibiogramma è un esame microbiologico utilizzato per saggiare la sensibilità di un microrganismo a uno o più farmaci antimicrobici. Permette al clinico di operare la scelta più appropriata di antibiotico-terapia per il trattamento dell'infezione batterica in atto.

Il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) così come il Comitato Europeo per i Test di Suscettibilità Antimicrobica (EUCAST) dettano le regole a livello internazionale su come fare i test di sensibilità agli antibiotici, le classi di antibiotici da testare e definiscono le linee guida per l'interpretazione della resistenza antimicrobica.

I test di sensibilità in vitro ai farmaci antimicrobici si possono suddividere principalmente in due tipologie: metodi di diluizione e metodi di diffusione.

6.2.1 Metodi di diluizione: Minima Concentrazione Inibente (MIC)

I metodi di diluizione si basano sulla valutazione della crescita dei microrganismi in presenza di concentrazioni scalari dell'antibiotico del quale si voglia valutare l'attività. Nella MIC la suscettibilità di un microrganismo ai diversi antibiotici viene espressa in concentrazione minima inibente. Ovvero la concentrazione più bassa (espressa ad es. in $\mu\text{g/mL}$ o mg/L) di un antibiotico in grado di inibire la crescita di un determinato ceppo batterico.

L'uso degli antibatterici in terapia è condizionato dal rapporto fra sensibilità del patogeno e la concentrazione che il farmaco raggiunge nella sede d'infezione. Ad esempio i farmaci liposolubili raggiungono livelli più elevati nel tessuto di quanto non facciano nel siero. I farmaci escreti dal rene raggiungono nella vescica livelli molto più elevati rispetto ai livelli sierici. Pertanto la terapia mirata non deve basarsi sulla base dei valori di MIC ma su criteri di farmacocinetica e farmacodinamica

Per l'esecuzione della MIC in micrometodo è necessario allestire una micropiastra a 96 pozzetti a fondo curvo con diluizioni scalari per raddoppio della soluzione madre dell'antibiotico da testare. L'inoculo del batterio in esame viene preparato da una coltura pura cresciuta overnight (18-20 h) su terreno di agar nutritivo non selettivo, in fase di crescita logaritmica. La concentrazione dell'inoculo viene dosata tramite la misura della torbidità con metodi spettrofotometrici o nefelometrici o visivi tramite comparazione con uno standard 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cellule/ml) e, dopo ulteriore diluizione in brodo di coltura (Mueller Hinton II Broth Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth per i test di sensibilità antimicrobica dei batteri che crescono aerobicamente), viene addizionato ai pozzetti della piastra contenenti le diluizioni scalari dell'antibiotico in esame. Dopo incubazione a temperatura di $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18 – 24h si leggono i risultati e la MIC è la più bassa concentrazione di farmaco che non consente una crescita visibile. Per validare i risultati:

il pozzetto di controllo della crescita (GC) deve risultare positivo, in caso contrario il test è da considerarsi non attendibile;

la verifica della reale concentrazione dell'inoculo, eseguita a partire dal pozzetto di crescita GC sia compresa tra 5×10^4 e 5×10^5 UFC/ml;

il controllo di purezza del ceppo sia confermato.

6.2.2. Metodi di diffusione: Kirby-Bauer

I metodi di diffusione, si basano su test di sensibilità in vitro di un microrganismo nei confronti di numerosi agenti antimicrobici su piastre di terreno solido agarizzato mediante applicazione, con tecniche differenti, di antibiotici sul terreno solido inoculato con il microrganismo da esaminare (metodo classico di Kirby-Bauer). L'antibiotico diffonde radialmente a partire dal

punto in cui è stato deposto creando un gradiente di concentrazione; nella zona circolare di agar dove l'antibiotico raggiunge una concentrazione uguale o superiore alla concentrazione minima inibente non si avrà crescita microbica ma si formerà una zona di inibizione il cui diametro è in relazione alla sensibilità del microrganismo all'antibiotico, maggiore è il diametro più è sensibile (correlazione inversa tra valore di MIC e diametro dell'alone di inibizione). L'antibiogramma si può effettuare applicando sulla superficie della piastra dischetti di carta da filtro sterili perfettamente aderenti contenenti concentrazione nota e standard di antibiotici; i chemioantibiotici diffondono in rapporto alla diffusibilità in terreno di coltura. Generalmente questi metodi vengono interpretati qualitativamente per distinguere i ceppi sensibili dai resistenti. Nell'esecuzione di un antibiogramma per diffusione bisogna prestare attenzione a:

- variabili di natura propriamente tecnica (tipo di piastra, qualità del terreno di coltura, applicazione corretta dell'antibiotico, ecc.);
- variabili di natura biologica (numero di microrganismi insemnati, temperatura di incubazione, tempo di incubazione). Pertanto una perfetta standardizzazione delle metodiche è alla base di una corretta interpretazione dei risultati.

Il metodo standardizzato più utilizzato è rappresentato da quello classico di Kirby-Bauer; con questa metodica il terreno di coltura deve rispondere ad alcune proprietà come pH e concentrazione ionica adeguati, concentrazione e spessore uniforme dell'agar. Poiché la diffusione dell'antibiotico nell'agar avviene in relazione all'uniformità dello spessore del terreno nelle piastre la metodica richiede:

- piastre piane e disposte su una superficie orizzontale;
- concentrazione dell'agar di 1,5-2%;

- spessore dell'agar di 4 mm calcolato in base alle dimensioni delle piastre e la quantità di terreno adoperato;
- scelta del terreno di coltura adeguato; generalmente si utilizza Mueller Hinton (pH compreso tra 7.2 e 7.4) il quale non interferisce con l'attività dei vari antibiotici. Tuttavia anche uno stesso terreno di coltura a seconda delle diverse partite può presentare notevoli differenze nella concentrazione ionica (la concentrazione di calcio e magnesio può interferire con la grandezza degli aloni di inibizione), nella conducibilità elettrica, ecc. Inoltre è da rilevare che l'aggiunta di sangue al terreno di coltura può modificare l'attività di un antibiotico.
- dosaggio dell'inoculo, necessario perché la grandezza degli aloni di inibizione è in relazione al numero di microrganismi seminati. Per standardizzare la densità dell'inoculo si può usare un metodo di comparazione visivo o spettrofotometrico o nefelometrico con uno standard McFarland. L'inoculo ottenuto da diluizione della coltura pura deve contenere una concentrazione 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cellule/ml);
- semina, entro 15 minuti dalla sua preparazione, dell'inoculo sulla superficie della piastra e deposizione dei dischetti contenenti gli antibiotici sul terreno di coltura.
- adeguata conservazione degli antibiotici onde evitare l'inattivazione;
- incubazione entro 15 minuti per evitare una pre-diffusione dell'antibiotici nella massa dell'agar a temperatura ambiente;
- incubazione in un termostato alla temperatura e nei tempi previsti in base al microrganismo e all'antibiotico;
- lettura della grandezza degli aloni di inibizione utilizzando un calibro adatto e valutazione degli aloni.

6.2.3 Interpretazione

Per tutti i saggi di sensibilità agli antibiotici, il passaggio dal dato quantitativo (valore di MIC o di diametro dell'alone di inibizione) all'interpretazione secondo le classiche categorie S (sensibile), I (intermedio), R (resistente), avviene applicando i cosiddetti breakpoint clinici, range interpretativi determinati da CLSI e EUCAST.

Le categorie interpretative SIR del risultato di sensibilità in vitro dell'antibiotico vanno considerate nel seguente modo in termini di predittività di efficacia clinica nei confronti del ceppo batterico in esame:

- S: efficacia dell'antibiotico utilizzato al dosaggio standard;
- I: efficacia dell'antibiotico utilizzato al dosaggio massimale previsto;
- R: non efficacia dell'antibiotico anche se utilizzato al dosaggio massimale previsto.

6.3 Test di conferma

Test di combinazione per ESBL: viene utilizzato per il rilevamento di Enterobatteri produttori di ESBL. Le ESBL sono enzimi in grado di degradare penicilline, cefalosporine e monobattami. Gli Enterobatteri in grado di produrre tali enzimi, risultano dunque resistenti a queste classi di antimicrobici, ma sensibili alla combinazione degli stessi con gli inibitori convenzionali delle β -lattamasi come l'acido clavulanico, il sulbactam, ecc. Secondo le CLSI il test può essere eseguito con la tecnica del Kirby Bauer o con quella della minima concentrazione inibente in brodo (MIC) e consiste nel valutare la crescita del microrganismo in esame in presenza degli antibiotici cefotaxime e ceftazidime e degli stessi in combinazione con l'acido clavulanico.

Con il test del Kirby Bauer un incremento del diametro maggiore o uguale a 5 mm di uno dei due antibiotici saggiati in combinazione con l'acido clavulanico rispetto alle molecole singole,

conferma la produzione di ESBL. Con il test della MIC un decremento di due/tre concentrazioni del valore di MIC di almeno uno dei due antibiotici saggiati in combinazione con l'acido clavulanico rispetto alle molecole singole conferma la produzione di ESBL.

Test di combinazione per AmpC. Poiché la resistenza intrinseca all'AmpC che ha minore rilevanza epidemica, spesso porta a letture false positive dell'ESBL è stato eseguito il test di combinazione anche per la produzione di enzimi di tipo AmpC. Gli enzimi AmpC idrolizzano le penicilline, la maggior parte delle cefalosporine (eccetto il cefepime), cefamicine (p. es., cefoxitina, cefotetan), monobattami (p. es., aztreonam). La loro particolarità consiste nel fatto che non vengono inibite dall'acido clavulanico, ma dalla cloxacillina. Quindi nel test condotto con due cefalosporine cefotaxime e ceftazidime sole e in combinazione con la cloxacillina un incremento del diametro maggiore o uguale a 5 mm di uno dei due antibiotici saggiati in combinazione con la cloxacillina rispetto alle molecole singole, conferma la produzione di AmpC.

Test di sinergia: Per confermare che i ceppi isolati siano produttori di carbapenemasi, è necessario effettuare un antibiogramma con metodo Kirby-Bauer, il test di sinergia secondo EUCAST. Per il rilevamento delle carbapenemasi negli isolati che mostrano una minore suscettibilità al meropenem si utilizzano dischetti contenenti il meropenem in associazione ad un inibitore delle varie carbapenemasi: l'acido fenilboronico inibisce le carbapenemasi di classe A (KPC o le meno frequenti GES, SME, IMI, NMC-A); l'EDTA inibisce le carbapenemasi di classe B dette Metallo Beta lattamasi (MBL) o Metallo Carbapenemasi (NDM, VIM, IMP o le meno frequenti GIM, SIM, SPM, DIM); non è attualmente disponibile alcun inibitore per le carbapenemasi di classe D (OXA tra cui OXA-48); la cloxacillina, che inibisce le β -lattamasi

di AmpC, è stata aggiunta ai test per differenziare tra iperproduzione di AmpC più perdita di porine e produzione di carbapenemasi. Anche l'EDTA in sinergia con l'imipenem inibisce le MBL.

Test della Minima Concentrazione Inibente della colistina: per confermare la resistenza alla colistina si utilizza la metodica della MIC in micrometodo usando la sola colistina. Un valore di MIC minore o uguale a 2mg/L è indice di sensibilità del ceppo; un valore di MIC maggiore di 2mg/L è indice di resistenza del ceppo.

6.4 Metodi automatizzati di identificazione – MALDI-TOF

La spettrometria di massa MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight) rappresenta una delle tecniche diagnostiche più in uso in quanto consente di identificare e caratterizzare rapidamente ed accuratamente microrganismi (batteri, micobatteri, lieviti e funghi) di interesse clinico. Ogni spettrometro di massa è costituito da tre componenti fondamentali:

- una sorgente ionica che provvede alla ionizzazione dell'analita, che è introdotto, a seconda del tipo di sorgente, "manualmente" o trasferito mediante un sistema cromatografico o elettroforetico;
- un analizzatore di massa che separa gli ioni prodotti in sorgente e accelerati da un campo elettromagnetico, in base al loro rapporto m/z;
- un rivelatore che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.

Un sistema di elaborazione e gestione dati genererà lo spettro di massa con valore m/z in ascisse e intensità del segnale in ordinate.

Sono molteplici le configurazioni strumentali dello spettrometro di massa applicabili all'analisi proteomica. Tali configurazioni differiscono per il sistema di ionizzazione, per il sistema di rivelazione e, soprattutto, per l'analizzatore, cioè per il componente che definisce l'intervallo delle masse rilevabili e conferisce allo strumento le sue caratteristiche di sensibilità e risoluzione.

Una delle configurazioni dello spettrometro di massa più in uso dispone di un sistema di ionizzazione del tipo MALDI (ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice) e di un analizzatore di tipo TOF (tempo di volo).

Questa tecnica analitica proteomica si basa sulla ionizzazione di macromolecole biologiche ad alto peso molecolare e sulla loro separazione, in base al rapporto massa/carica (m/z). Gli spettri di massa derivanti sono costituiti da un insieme di picchi ionici di diversa intensità, ciascuno corrispondente al valore di massa/carica di uno ione molecolare (Volta *et al.*, 2012).

L'identificazione è possibile perché ogni specie microbica presenta un proprio profilo spettrale che ne conferisce una specifica identità.

In questa tecnica, le molecole dell'analita vengono fatte cristallizzare con una matrice, costituita da acido organico debole e non volatile, in grado di assorbire radiazioni UV, proteggendo il campione. A seguito dell'assorbimento d'energia indotto dal laser, la matrice passa ad uno stato eccitato e l'energia viene utilizzata per generare ioni molecolari che vengono accelerati verso l'analizzatore a tempo di volo che ne misura il rapporto massa/carica in base al tempo impiegato dall'analita per percorrere la distanza tra la sorgente e il rivelatore. Maggiore sarà la massa della proteina, più lentamente raggiungerà il rivelatore pertanto il tempo di volo è inversamente proporzionale alla massa ionica.

La matrice più utilizzata è l'acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico (HCCA), che è sciolta in una soluzione di acetonitrile/acqua al 50:47,5 v/v e contenente il 2,5% di acido trifluoroacetico (per favorire la ionizzazione).

All'operatore viene restituito uno spettro di massa caratteristico ed univoco della specie microbica in esame. L'identificazione microbica è possibile dal confronto dello spettro sperimentale con gli spettri di riferimento presenti nel database. Questa tecnica oltre che efficiente è anche molto economica e inoltre ha mostrato una alta riproducibilità (Mellmann *et al.*, 2009).

6.5 Whole Genome Sequencing (WGS) con piattaforma ILLUMINA

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 (Deurenberg *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 (Long *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 *et al.*, 2017), nonché per identificare nuovi meccanismi di patogenicità e resistenza (Ferdous *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 *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 *et al.*, 2015), nonché per l'identificazione tempestiva di focolai epidemici (Eyre *et al.*, 2015; Joensen *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.

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

un'amplificazione di entrambi i filamenti, forward e reverse, per ciascun frammento generato. Questo processo genera milioni di cluster a ridosso della flowcell. Successivamente inizia la fase di sequenziamento vero e proprio: i filamenti reverse vengono rimossi e per ognuno dei filamenti rimasti adesi alla flowcell viene sintetizzato un filamento complementare grazie a un primer di sequenziamento e per ogni nucleotide inserito viene visualizzato un segnale fluorescente in seguito ad eccitazione da parte di una sorgente luminosa. Ogni segnale luminoso ricevuto dal detector viene convertito in una specifica base. Lo stesso processo avviene in maniera analoga per il filamento reverse, grazie a una nuova fase di amplificazione distinta.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Campionamento

Sono stati analizzati 1.000 campioni di alimenti di origine animale e vegetale prelevati in Puglia e Basilicata nel periodo compreso tra il 2018 e il 2023.

Gli alimenti sono stati distinti in due gruppi:

Alimenti crudi ovvero alimenti che hanno bisogno di essere cucinati prima di essere consumati e alimenti ready to eat (rte), ovvero alimenti pronti per il consumo.

Gli alimenti crudi (figura 9) erano suddivisi nelle seguenti categorie:

latte crudo (n=52) es. latte da distributori automatici, latte di massa, ecc.;

carni e derivati (n=207) es. carni avicole, di maiale, di bovino, di tacchino, di equino, sia a pezzi che tritati o preparazioni quali salsicce o hamburger;

prodotti della pesca (n=133) es. molluschi bivalvi, pesce, ecc.;

pasta fresca, preparati per prodotti da forno e per pasticceria (n=28) es. pasta all'uovo ripiena,

pasta frolla cruda, ecc.;

vegetali (n=80) es. verdure a foglia, ortaggi, frutta, ecc.

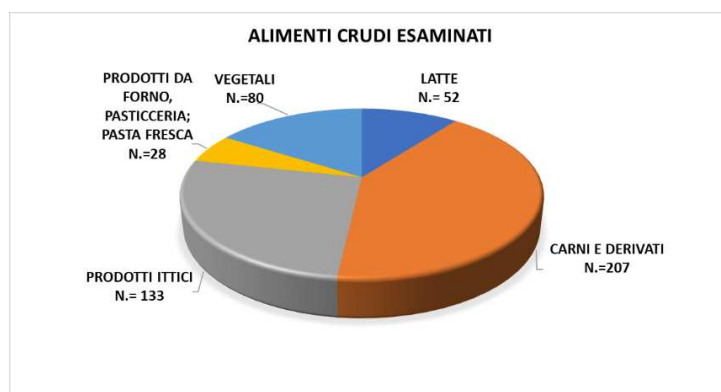


Figura 9. Numero di alimenti crudi esaminati divisi per categoria

Gli alimenti rte (figura 10) erano suddivisi nelle seguenti categorie:

latte e derivati (n=240) es. latte pastorizzato, formaggi a pasta filata, formaggi freschi o stagionati, ecc.;

derivati della carne (n=35) es. salsiccia stagionata di maiale, mortadella, pancetta, ecc.;

preparazioni gastronomiche (n=100) es. insalata russa, salmone impanato cotto al forno, ecc.;

prodotti da forno e di pasticceria (n=27) es. crema pasticcera, bignè, ecc.;

vegetali (n=32) es. insalata di IV gamma, frutta IV gamma, ecc.;

gelati (n=66) artigianali e confezionati.

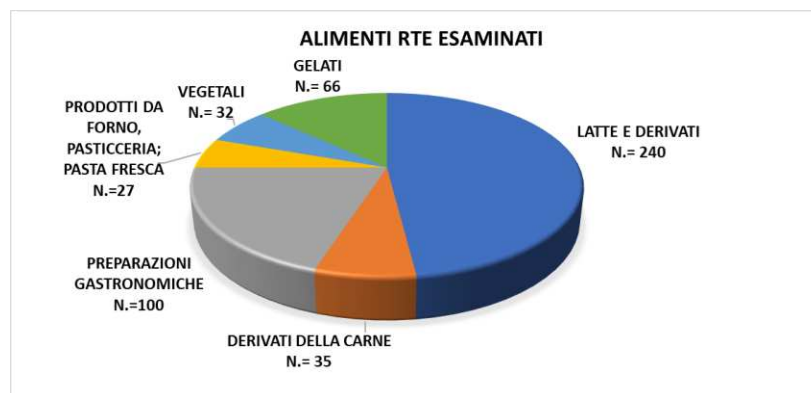


Figura 10. Numero di alimenti rte esaminati divisi per categoria

I campioni sono stati prelevati in condizioni di sterilità e conservati a 4-7 °C fino alla consegna in laboratorio, che avveniva comunque entro 24h dal prelievo. In laboratorio i campioni sono stati stoccati a -80°C fino al momento dell'analisi.

7.2 Isolamento di Enterobatteri resistenti agli antibiotici

I campioni di alimenti sono stati suddivisi in gruppi di dieci per essere esaminati per la ricerca di Enterobatteri produttori di ESBL e/o resistenti alla colistina e/o ai carbapenemi.

7.2.1 Preparazione della sospensione iniziale e arricchimento selettivo

I campioni sono stati sottoposti a scongelamento a temperatura di refrigerazione (+4°C); quindi, per ciascun campione, sono stati misurati 5 g (o ml) in busta stomacher sterile (Figura 11), poi, in ciascuna busta, sono stati aggiunti 45 ml di Buffered Peptone Water (BPW, Biolife, Milano, Italia), un brodo di pre-arricchimento. Ogni busta è stata omogeneizzata in omogeneizzatore peristaltico (Figura 12) (Stomacher, Seward, Worthing, United Kingdom) per 30 secondi, ed è stata incubata a 37°C per (18 ± 2) ore. Al termine dell'incubazione, da ciascuna busta è stato prelevato 1 ml di brodocoltura ed è stato inoculato in 10 ml di Enterobacteriaceae Enrichment Broth-Mossel (EE Broth-Mossel) 1X (Liofilchem® - Italy), un terreno selettivo utilizzato per la ricerca dei batteri Gram negativi bile tolleranti negli alimenti, nell'acqua ed in altri materiali di importanza, successivamente incubato a 37°C per (24 ± 2) ore.



Figura 11. Sacchetti sterili per Stomacher



Figura 12. Omogenizzatore Stomacher

7.2.2 Isolamento di Enterobatteri su terreni di coltura cromogeni

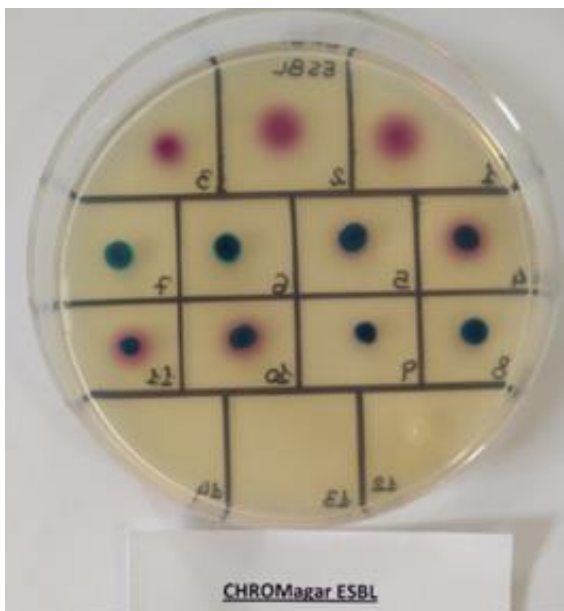
Al termine dell'incubazione, 10 microlitri di ciascuna brodocoltura EE BROTH 1X sono stati seminati sulla superficie di ciascuna piastra di terreno selettivo cromogeno. In particolare sono stati utilizzati tre tipi di terreni cromogeni: CHROMagarTMESBL, CHROMagarTMCOL-APSE e CHROMagarTMmSuperCARBA (CHROMagar, Paris, France). Tutte le piastre sono state incubate a 37 °C per (24 ± 2) ore. I tre terreni di coltura CHROMagar permettono la crescita di enterobatteri, rispettivamente, produttori di β-lattamasi a spettro esteso, resistenti alla colistina e resistenti ai carbapenemi.

Dopo l'incubazione le piastre sono state esaminate per ricercare la presenza di colonie tipiche di enterobatteri.

Fase preliminare

Al fine di verificare l'aspetto delle colonie degli enterobatteri sui tre terreni cromogeni, l'analisi dei campioni di alimenti, è stata preceduta dalla semina su CHROMagar ESBL di ceppi noti di *E. coli*, *K. pneumoniae* ed *Enterobacter* spp. produttori di ESBL e *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* non produttori di ESBL (figura 13 e 14); le stesse semine, ma con ceppi resistenti alla colistina è stata eseguita su CHROMagar COLAPSE. I ceppi di *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* non produttori di ESBL non sono cresciuti sul terreno CHROMagar ESBL.

Le colonie tipiche, isolate dai tre terreni cromogeni, sono state selezionate e seminate, in modo tale da avere colonie ben isolate, su terreno di agar sangue. Le piastre di agar sangue sono state incubate a 37 °C per (24 ± 2) ore. Al termine dell'incubazione, dopo aver verificato la purezza della coltura batterica, i ceppi sono stati sottoposti ad una prima identificazione.



1. *E. coli* ESBL (ceppo 1);
2. *E. coli* ESBL (ceppo 2);
3. *E. coli* ESBL (ceppo 3);
4. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. A);
5. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. B);
6. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. C);
7. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. D);
8. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. E);
9. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. F);
10. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. G);
11. *K. pneumoniae* ESBL (ceppo n. H);
12. *A. baumannii*
13. *S. aureus*
14. *B. cereus*

Figura 13. piastra di CHROMagar ESBL inocolata, mediante semina, con 14 diversi ceppi: da ceppo n.1 a n.11 è stata verificata la crescita con lo sviluppo del colore specifico di ceppi produttori di ESBL; da ceppo n.12 a n. 14 è stata verificata l'inibizione della crescita di ceppi non produttori di ESBL.



(a)

(b)

(c)

Figura 14. Aspetto delle colonie dei ceppi noti di *E. coli* (a), *Klebsiella spp.* (b) ed *Enterobacter spp.* (c) sui terreni cromogeni CHROMagar COL-APSE, CHROMagar ESBL, CHROMagar mSuperCARBA

7.3. Identificazione degli isolati mediante analisi MALDI-TOF

I ceppi sono stati identificati mediante la tecnica della Spettrometria di massa MALDI-TOF.

Gli spettri di massa degli estratti proteici microbici sono stati raccolti utilizzando uno spettrometro di massa Microflex LT/SH™ (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Germania). Per l'analisi mediante tecnologia MALDI TOF, vengono utilizzate colture pure e fresche, cresciute in piastra secondo protocolli in uso.

In breve, ciascuna colonia del campione di interesse viene stemperata con uno stuzzicandenti su uno spot del target plate al quale, dopo l'essiccazione a temperatura ambiente, è stato aggiunto 1 µL di soluzione di matrice, acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA).

Ogni spot del target plate è stato bombardato in più punti e ripetutamente con un raggio laser ad azoto pulsato operante a 337 nm, con una frequenza pari a 60 Hz, che determina la disgregazione/ionizzazione del campione in numerosissimi frammenti e l'accelerazione, da un campo elettromagnetico, nel cosiddetto "tubo di volo" per raggiungere e colpire una membrana

che rileverà e registrerà le masse ionizzate impattanti in tempi differenti in base alla massa stessa degli ioni. L'acquisizione degli spettri dei campioni è svolta in modalità lineare in un intervallo di m/z che comprende un range massa/carica (m/z) compreso tra 2 e 20 kDa. Essa, viene eseguita sommando più spettri ottenuti da acquisizioni automatiche successive in posizioni diverse del pozzetto in cui è stato depositato il campione; in questo modo si riesce a migliorare il rapporto segnale/rumore di fondo dello spettro, scartando tutti gli spettri che presentano scarsa risoluzione e basso rapporto segnale/rumore.

Lo strumento è stato calibrato utilizzando come standard il BTS, un estratto del ceppo di *Escherichia coli* DH5 α , addizionato di due proteine aggiuntive (RNasi A di 13683,2 Da e mioglobina di 16952,3 Da), che estendono il range di massa coperto dal BTS. La gamma di massa complessiva coperta da BTS è compresa tra 3,6 e 17 kDa. La calibrazione è stata effettuata prima di ogni corsa di identificazione.

Lo strumento è collegato ad un software in grado di acquisire i dati in arrivo, elaborarli in spettri di massa e confrontarli con spettri di riferimento presenti nel database interno.

7.4 Prove di conferma

Gli enterobatteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati dai tre terreni cromogeni e identificati mediante Maldi-Tof, sono stati sottoposti alle prove di conferma per accertarne l'antibiotico-resistenza, mediante i test di sensibilità agli specifici antibiotici.

Preparazione del campione (ceppo) in esame

Sono state utilizzate due tecniche: il test di diffusione in agar (Kirby Bauer) e la minima concentrazione inibente in brodo (MIC). Entrambe le metodiche richiedono la preparazione di

una sospensione 0,5 McFarland (da 1 a 2×10^8 CFU/ml di *E. coli* ATCC 25922), che si esegue stemperando, con un'ansa sterile, poche colonie del ceppo, cresciuto sulla piastra di agar sangue, in soluzione fisiologica 0,9% sterile. La corretta concentrazione (0,5 McFarland) viene verificata tramite lettura al nefelometro (Trek Diagnostics).

Nella metodica Kirby Bauer, la sospensione 0,5 McFarland viene seminata, entro 15 minuti, immergendo in essa un tampone sterile e strisciandolo in modo uniforme su una piastra di Mueller Hinton agar II (Difco™) su cui poi vengono applicati, con l'aiuto di una pinza sterile, i dischetti antibiotici.

Nella metodica MIC, entro 15 minuti, 10 µl della sospensione batterica 0,5 McFarland vengono trasferiti in una provetta contenente 11 ml di Mueller Hinton Broth II (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth) al fine di ottenere, dopo l'inoculazione nei pozzetti di una micropiastra, in ogni pozzetto all'incirca 1×10^5 UFC/ml (range 5×10^4 UFC/ml – 5×10^5 UFC/ml).

Conta delle colonie vitali per la verifica delle UFC/ml

La metodica MIC prevede anche di verificare la purezza del ceppo in esame e di contare le unità formanti colonie (UFC/ml) inoculate nei pozzetti della micropiastra contenente gli antibiotici. Entrambe le verifiche devono essere effettuate a partire dalla sospensione di inoculo contenuta nel pozzetto di controllo della crescita batterica. I pozzetti della micropiastra, dopo l'inoculo della sospensione batterica, dovranno contenere approssimativamente: 1×10^5 UFC/ml (range 5×10^4 UFC/ml – 5×10^5 UFC/ml). Allo scopo si deve operare nel modo seguente:

prelevare 0,01ml (10 µl) dal pozzetto controllo della crescita (presente in ogni micropiastra) subito dopo l'inoculazione e aggiungere a 10 ml di diluente salino (1:1000). Mescolare e piastrare per spatolamento 0,1ml (100 µl) su di una piastra di agar sangue (AS).

Incubare overnight a 35 ± 2 °C. Per una sospensione con concentrazione accettabile per il test, ci si attende di osservare la crescita compresa tra le 5 e le 50 colonie. Se questa condizione non si verifica o se il ceppo non dovesse risultare puro, il risultato per l'isolato in esame non può essere utilizzato e va ripetuta l'analisi.

7.4.1 Produzione di ESBL e AmpC: Test di combinazione

Gli enterobatteri isolati dal terreno CHROMagarESBL sono stati sottoposti a test di conferma per la produzione di beta lattamasi a spettro esteso e di AmpC, mediante test di combinazione secondo le CLSI (CLSI, 2021). Sono state utilizzate due tecniche: Kirby Bauer e Minima Concentrazione Inibente (MIC).

Test di combinazione con metodica Kirby Bauer

Con l'aiuto di una pinza sterile, sono stati prelevati, dalle rispettive cartucce, i dischetti dei seguenti antibiotici:

- cefotaxime (30 µg)
- cefotaxime + acido clavulanico (30/10 µg)
- ceftazidime (30 µg)
- ceftazidime + acido clavulanico (30/10 µg)

e sono stati disposti sulla piastra di Mueller Hinton agar II che era stata seminata con la sospensione 0,5 McFarland del ceppo in esame. I dischetti vengono disposti in modo

equidistante tra loro esercitando una lieve pressione sulla superficie del dischetto per assicurarne il contatto uniforme con il terreno.

Le piastre sono state incubate in termostato a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16/18 ore.

Lettura ed interpretazione

Al termine dell'incubazione sono stati misurati, con l'aiuto di un calibro, il diametro degli aloni di inibizione.

Un incremento del diametro maggiore o uguale a 5 mm di uno dei due antibiotici saggiati in combinazione con l'acido clavulanico rispetto alle molecole singole, conferma la produzione di ESBL (CLSI M100) (figura 15).

Esecuzione del test di combinazione per AmpC

Con l'aiuto di una pinza sterile, sono stati prelevati, dalle rispettive cartucce, i dischetti dei seguenti antibiotici:

- cefotaxime (30 µg)
- cefotaxime + cloxacillina (30/10 µg)
- ceftazidime (30 µg)
- ceftazidime + cloxacillina (30/10 µg)

e sono stati disposti sulla piastra di Mueller Hinton agar II che era stata seminata con la sospensione 0,5 McFarland del ceppo in esame. I dischetti vengono disposti in modo equidistante tra loro esercitando una lieve pressione sulla superficie del dischetto per assicurarne il contatto uniforme con il terreno.

Le piastre sono state incubate in termostato a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16/18 ore.

Lettura ed interpretazione

Al termine dell'incubazione sono stati misurati, con l'aiuto di un calibro, il diametro degli aloni di inibizione.

Un incremento del diametro maggiore o uguale a 5 mm di uno dei due antibiotici saggiati in combinazione con la cloxacillina rispetto alle molecole singole, conferma la produzione di AmpC.

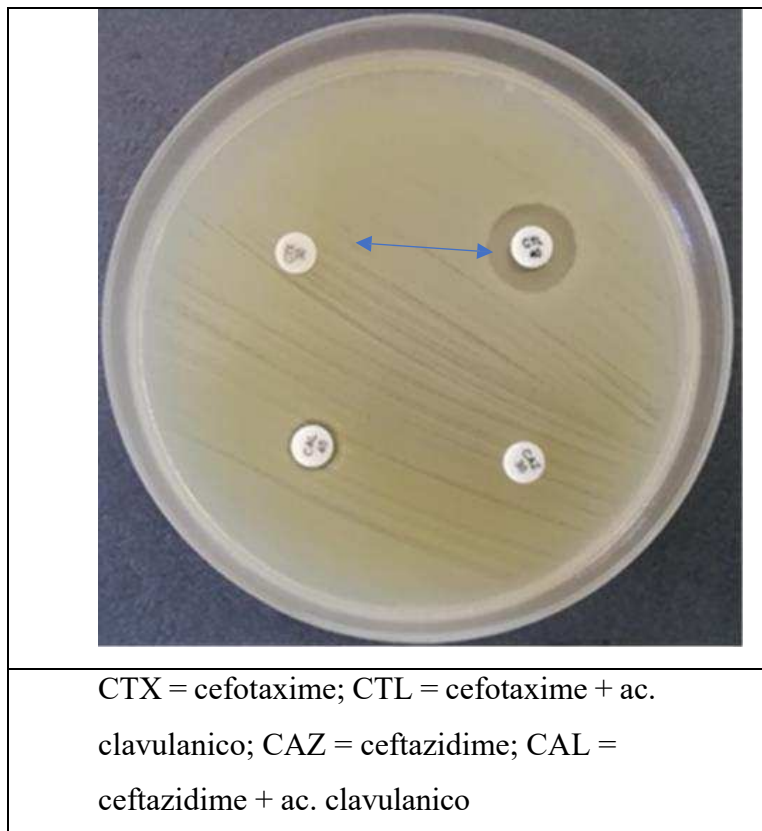


Figura 15. Test di combinazione ESBL. Un incremento ≥ 5 mm dell'antibiotico (cefotaxime e/o ceftazidime) in combinazione con l'ac. clavulanico indica la produzione di ESBL.

Test di combinazione con metodica MIC per ESBL/AmpC

Ogni pozzetto delle piastre EUVSEC2 della Trek Diagnostics, contenenti i seguenti antibiotici:

Antibiotico	Range µg/ml
FOX - Cefoxitina	0,5-64
MERO - Meropenem	0,03-16
FOT - Cefotaxime	0,25-64
TAZ - Ceftazidime	0,25-128
F/C - Cefotaxime / ac. clavulanico	0,06/4-64/4
T/C - Ceftazidime / ac. clavulanico	0,12/4-128/4

È stato inoculato con 50 µl di Mueller Hinton Broth II preparato a partire dalla sospensione 0,5 McFarland. La micropiastra è stata poi incubata a 35 ±2°C per 18-20 ore. Per ogni ceppo in esame è stata eseguita la conta delle colonie vitali per la verifica delle UFC/ml.

Lettura e interpretazione

Al termine dell'incubazione è stata effettuata la lettura.

La presenza di un bottone sul fondo del pozzetto indica la presenza di crescita batterica.

La MIC viene registrata come la concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita batterica.

L'interpretazione delle letture è stata eseguita secondo le CLSI M100

Un decremento della MIC minore o uguale a 2 - 3 diluizioni di uno dei due antibiotici saggiati (F/C e T/C) in combinazione con l'acido clavulanico rispetto alle molecole singole (FOT e TAZ), conferma la produzione di ESBL (CLSI M100) (figura 16).

Una MIC dei due antibiotici FOT o TAZ >1mg/L con la MIC della cefoxitina FOX >8mg/L e nessuna sinergia FOT-F/C o TAZ-T/C indica produzione di AmpC, secondo le indicazioni EFSA Appendice O (EFSA Journal 2019, 17(6):5709).

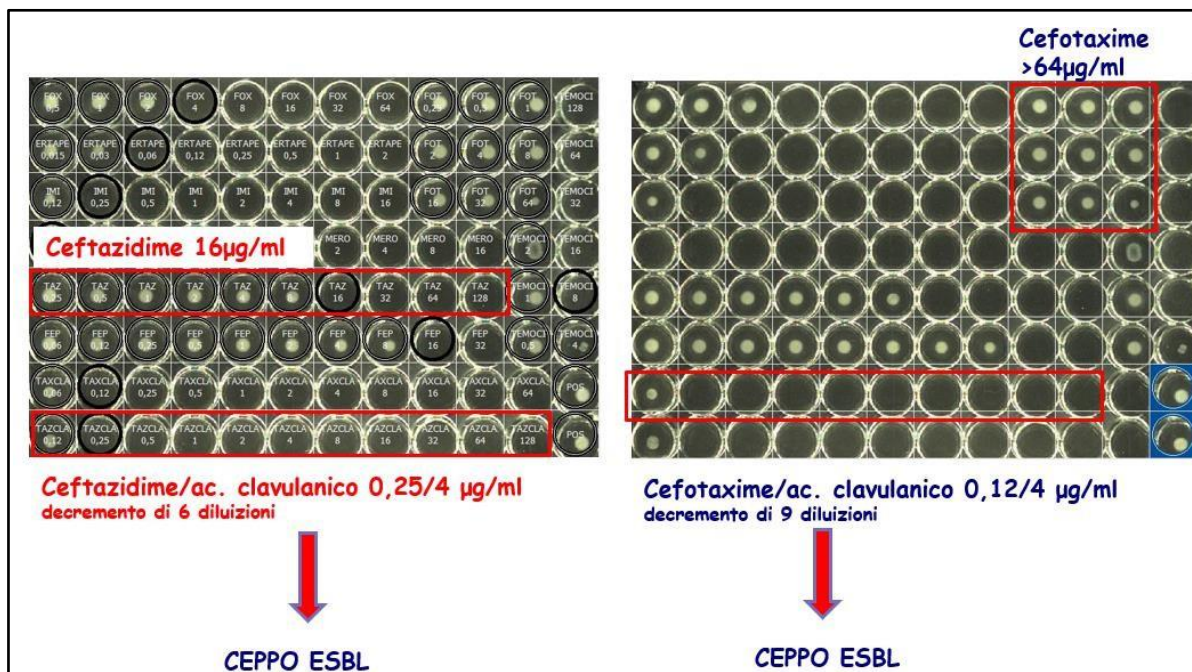


Figura 16. Lettura di un pannello EUVSEC2 di un ceppo produttore di ESBL

7.4.2 Resistenza alla Colistina: Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Gli enterobatteri isolati dal terreno CHROMagar COL-APSE sono stati sottoposti a test di valutazione della resistenza alla colistina utilizzando il metodo della minima concentrazione inibente (MIC).

Ogni pozzetto della MIC Strip Colistin (MICRONAUT MIC-Strip MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany), avente un range di concentrazione di colistina compreso tra 0.0625 e 64 mg/L, è stato inoculato con 100 µl di sospensione batterica Mueller Hinton Broth. Il preparato a partire dalla sospensione 0,5 McFarland. Lo strip colistin viene incubato a 37°C per 18-22 ore in atmosfera umida. Per ogni ceppo in esame è stata eseguita la conta delle colonie vitali per la verifica delle UFC/ml.

Letture e interpretazione

Al termine dell'incubazione delle MIC Strips Colistin è stata effettuata la lettura: l'intorbidimento del pozzetto indica la presenza di crescita batterica.

Per poter considerare valido il test si è verificato l'intorbidimento del pozzetto di controllo della crescita (GC), in caso contrario il test è da considerarsi "non attendibile".

La MIC viene registrata come la concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita batterica.

Un valore di MIC minore o uguale a 2 mg/L è indice di sensibilità del ceppo alla colistina; un valore di MIC maggiore di 2 mg/L è indice di resistenza del ceppo testato alla colistina.

7.4.3 Resistenza ai carbapenemi e test di sinergia

Gli enterobatteri isolati dal terreno CHROMagar mSuperCARBA sono stati sottoposti al test Kirby-Bauer per verificare la reale resistenza agli antibiotici carbapenemi e al test di sinergia per verificare la produzione di carbapenemasi.

Resistenza ai carbapenemi

Per confermare che i ceppi isolati siano effettivamente resistenti ai carbapenemi, è necessario effettuare un antibiogramma con metodo Kirby-Bauer utilizzando gli antibiotici appartenenti alla classe dei carbapenemi (Magiorakos *et al.*, 2012).

Con l'aiuto di una pinza sterile, sono stati prelevati, dalle rispettive cartucce, i dischetti degli antibiotici: aztreonam 30 µg, ertapenem 10 µg, doripenem 10 µg, meropenem 10 µg e imipenem 10 µg, e sono stati disposti sulla piastra di Mueller Hinton agar II che era stata seminata con la sospensione 0,5 McFarland del ceppo in esame.

Le piastre sono state incubate in termostato a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16/18 ore.

Lettura ed interpretazione

Al termine dell'incubazione sono stati misurati, con l'aiuto di un calibro, il diametro degli aloni di inibizione. Il risultato di ogni antibiotico testato è stato espresso secondo le CLSI M100 (Tabella 2):

Tabella 2. Antibiotici carbapenemi con i relativi valori di Breakpoint

ANTIBIOTICO	SIGLA	CONC.	S	I	R
MEROPENEM	MRP	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19
AZTREONAM	ATM	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17
ERTAPENEM	ETP	10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18
DORIPENEM	DOR	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19
IMIPENEM	IMI	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19

Test di sinergia

Per gli enterobatteri risultati resistenti ad uno o più antibiotici carbapenemi saggiati, è stato eseguito il test di sinergia per verificare che il meccanismo di resistenza del ceppo, sia dovuto alla produzione degli enzimi carbapenemasi.

Con l'aiuto di una pinza sterile, sono stati prelevati, dalle rispettive cartucce, i dischetti degli antibiotici:

- meropenem (10 µg)
- meropenem + EDTA
- meropenem + acido fenilboronico
- meropenem + cloxacillina

e sono stati disposti sulla piastra di Mueller Hinton agar II che era stata seminata con la sospensione 0,5 McFarland del ceppo in esame.

Le piastre sono state incubate in termostato a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16/18 ore.

Per confermare la produzione di Metallo Beta Lattamasi (MBL), è stato eseguito un ulteriore test di sinergia, utilizzando i dischetti:

- imipenem (10 μg)
- imipenem + EDTA

Lettura ed interpretazione

Al termine dell'incubazione sono stati misurati, con l'aiuto di un calibro, il diametro degli aloni di inibizione. I risultati sono stati interpretati osservando l'incremento dell'alone di inibizione come indicato nelle tabelle seguenti (tabelle 3 e 4):

Tabella 3. Interpretazione test di sinergia con meropenem (EUCAST)

Aumento della zona di inibizione tra meropenem e meropenem con l'inibitore			INTERPRETAZIONE
MEROPENEM + EDTA	MEROPENEM+ ACIDO FENILBORONICO	MEROPENEM+ CLOXACILLINA	
< 5 mm	< 5 mm	< 5 mm	non produttore di carbapenemasi o blaOXA48
≥ 5 mm	< 5 mm	< 5 mm	produttore di MBL (blaVIM, blaNDM, blaIMP)
< 5 mm	≥ 5 mm	< 5 mm	produttore di KPC
< 5 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm	AmpC + perdita di porine

Tabella 4. Interpretazione test di sinergia con imipenem (EUCAST)

Aumento della zona di inibizione tra imipenem e imipenem con l'inibitore	INTERPRETAZIONE
IMIPENEM + EDTA	
≥ 8 mm	produttore di MBL (blaVIM, blaNDM, blaIMP)

7.5 Test di sensibilità agli antibiotici Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Tutti i ceppi isolati che erano resistenti alla colistina e/o produttori di ESBL e/o carbapenemasi identificati come appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* sono stati saggiati per valutare la sensibilità agli antibiotici appartenenti alle seguenti classi: Penicilline; Beta lattamici in combinazione con agente inibitore; Macrolidi; Amminoglicosidi; Cloramfenicoli; Chinoloni; Cefalosporine; Tetracicline; Sulfonamidi, Monobattami; Carbapenemi (Tabella 5). A tale scopo sono stati utilizzati i pannelli GN4F[®], CMV4AGNF[®] and EUVSEC[®] (Trek Diagnostic Systems, Westlake, OH, USA) (il pannello EUVSEC[®] contiene il test di combinazione) in accordo con le Clinical and Laboratory Standards Institute (Weinstein, 2021)

Tabella 5. Classe degli antibiotici esaminati e relativi range di concentrazione di ciascun antibiotico

Classe antibiotico	Antibiotico	Range µg/ml
Penicilline	AMP - Ampicillina	1-32
	PIP - Piperacillina	16-64
β-lattamico con inibitore	AUG2 - Amoxicillina / ac. clavulanico	1/0,5-32/16
	A/S2 - Ampicillina / Sulbactam	4/2-16/8
	P/T4 - Piperacillina/Tazobactam	8/4-128/4
	TIM2 - Ticarcillina/ac. clavulanico	8/2-64/2
Macrolidi	AZI - Azithromycina	0,25-32
Aminoglicosidi	AMI - Amikacina	8-32
	GEN - Gentamicina	0,25-16
	STR - Streptomicina	2-64
	TOB - Tobramicina	2-8
Fenicoli	CHL - Cloramphenicolo	2-32
Quinoloni (Fluoroquinoloni)	CIP - Ciprofloxacin	0,015-4
	LEVO - Levofloxacin	1-8
Quinoloni	NAL - Acido Nalidixico	0,5-32
Cephems (Cefalosporine I ^c)	FAZ - Cefazolina	1-16
Cephems (Cefalosporine II ^c)	FOX - Cefoxitina	0,5-64
Cephems (Cefalosporine III ^c)	AXO - Ceftriaxone	0,25-64
Cephems (Cefalosporine IV ^c)	FEP - Cefepime	0,06-32
Tetracicline	MIN - Minocyclina	1-8
	TET - Tetracyclina	4-32
	TGC - Tigecyclina	1-8
Sulfonamidi	FIS - Sulfisoxazole	16-256
	SXT - Trimethoprim / Sulfamethoxazole	0,12/2,38-4/76
Monobattami	AZT - Aztreonam	1-16
Penems (Carbapenemi)	MERO - Meropenem	0,03-16
	DOR - Doripenem	4-8
	ETP - Ertapenem	0,25-8
	IMI - Imipenem	0,12-16
Lipopeptidi (Polymyxine)	COL - Colistina	0.0625 - 64
test di combinazione ESBL	FOT - Cefotaxime	0,25-64
	TAZ - Ceftazidime	0,25-128
	F/C - Cefotaxime / ac. clavulanico	0,06/4-64/4
	T/C - Ceftazidime / ac. clavulanico	0,12/4-128/4

Ogni pozzetto delle micropiastre Trek Diagnostics, contenenti antibiotici con diversi range di concentrazione, è stato inoculato con 50 µl di Mueller Hinton Broth II preparato a partire dalla sospensione batterica 0,5McFarland. Le micropiastre sono state incubate a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-20 ore. Per ogni ceppo in esame è stata eseguita la conta delle colonie vitali per la verifica delle UFC/ml.

Lettura e interpretazione

Al termine dell'incubazione è stata effettuata la lettura.

La presenza di un bottone sul fondo del pozzetto indica la presenza di crescita batterica.

La MIC viene registrata come la concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita batterica.

E. coli ATCC 25922 è stato utilizzato come ceppo di controllo. L'interpretazione delle letture è stata eseguita secondo le CLSI M100.

I batteri multi-resistenti (MDR) sono stati definiti come non suscettibilità acquisita ad almeno 1 agente in 3 o più categorie antimicrobiche (Magiorakos *et al.*, 2012).

7.6 Estrazione del DNA

Gli enterobatteri, che alle prove di conferma, sono risultati produttori di ESBL e/o colistino resistenti e/o resistenti ai carbapenemi, sono stati sottoposti all'estrazione del DNA con il kit Illustra Bacteria genomicprep Mini spin kit (GE Healthcare Amersham Biosciences) secondo le istruzioni del produttore. Il metodo prevede una prima fase di rottura delle cellule con soluzioni di estrazione, buffer TE e proteinasi K. Segue il trasferimento nelle colonnine contenenti membrane di silice in grado di trattenere in DNA che viene purificato con due lavaggi con

soluzione di lavaggio. Il DNA viene poi eluito e staccato dalla membrana con il Buffer TE.

La concentrazione di DNA è stata misurata con un Fluorimetro Qubit 3.0 e il kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific).

7.7 Whole Genome Sequencing (WGS)

Il DNA estratto dagli isolati in esame è stato sottoposto al sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS). Questo approccio ha consentito di indagare in maniera più approfondita le caratteristiche genetiche di virulenza ed antibiotico-resistenza di ogni singolo isolato produttore di ESBL e/o resistente alla colistina e/o carbapenemi.

Preparazione delle Librerie e Sequenziamento

Le librerie sono state preparate utilizzando il kit Illumina DNA Prep e sequenziate sulla piattaforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) con il kit MiSeq Reagent V2 (500 cicli), come precedentemente descritto (Bianco *et al.*, 2021).

Analisi Bioinformatica

L'analisi bioinformatica è stata eseguita sulla piattaforma Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). L'assemblaggio de novo del genoma è stato effettuato con SPAdes v3.15 (Bankevich *et al.*, 2012) e la qualità dell'assemblaggio è stata valutata con Quast v5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013). L'identificazione delle specie è stata eseguita tramite ribosomal MLST (<https://pubmlst.org/species-id>). Per il rilevamento dei geni di resistenza antimicrobica (AMR) e dei geni di virulenza è stato utilizzato lo strumento ABRicate Mass screening (Versione 1.0.1 di Galaxy), selezionando l'opzione PlasmidFinder per prevedere i repliconi plasmidici. Per tutti gli strumenti menzionati sono stati applicati i parametri predefiniti.

8. RISULTATI

8.1 Isolamento di Enterobatteri dai terreni cromogeni

Tutte le colonie cresciute sui tre terreni cromogeni CHROMagarTMESBL, CHROMagarTMCOL-APSE e CHROMagarTMmSuperCARBA, che presentavano un aspetto tipico (figura 17) sono state seminate su terreno agar sangue per consentire la crescita a colonie isolate.

Sono state isolate 482 colonie da 378 campioni di alimenti.

8.2 Identificazione degli isolati mediante tecnica MALDI TOF

Tutti gli isolati sono stati identificazione con la tecnica della spettrometria di massa MALDI-TOF e sono stati identificati come segue:

- da terreno COLAPSE sono stati isolati 255 enterobatteri appartenenti ai generi e alle specie: *Serratia* spp; *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Atlantibacter hermannii*, *Moellerella wisconsensis*, *Kosakonia cowanii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Phytobacter diazotrophicus*.
- da terreno ESBL sono stati isolati 182 enterobatteri appartenenti ai generi e alle specie: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp.
- da terreno superCARBa sono stati isolati 45 enterobatteri appartenenti ai generi e alle specie: *Stenothrophomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Moellerella wisconsensis*, *Enterobacter* spp..

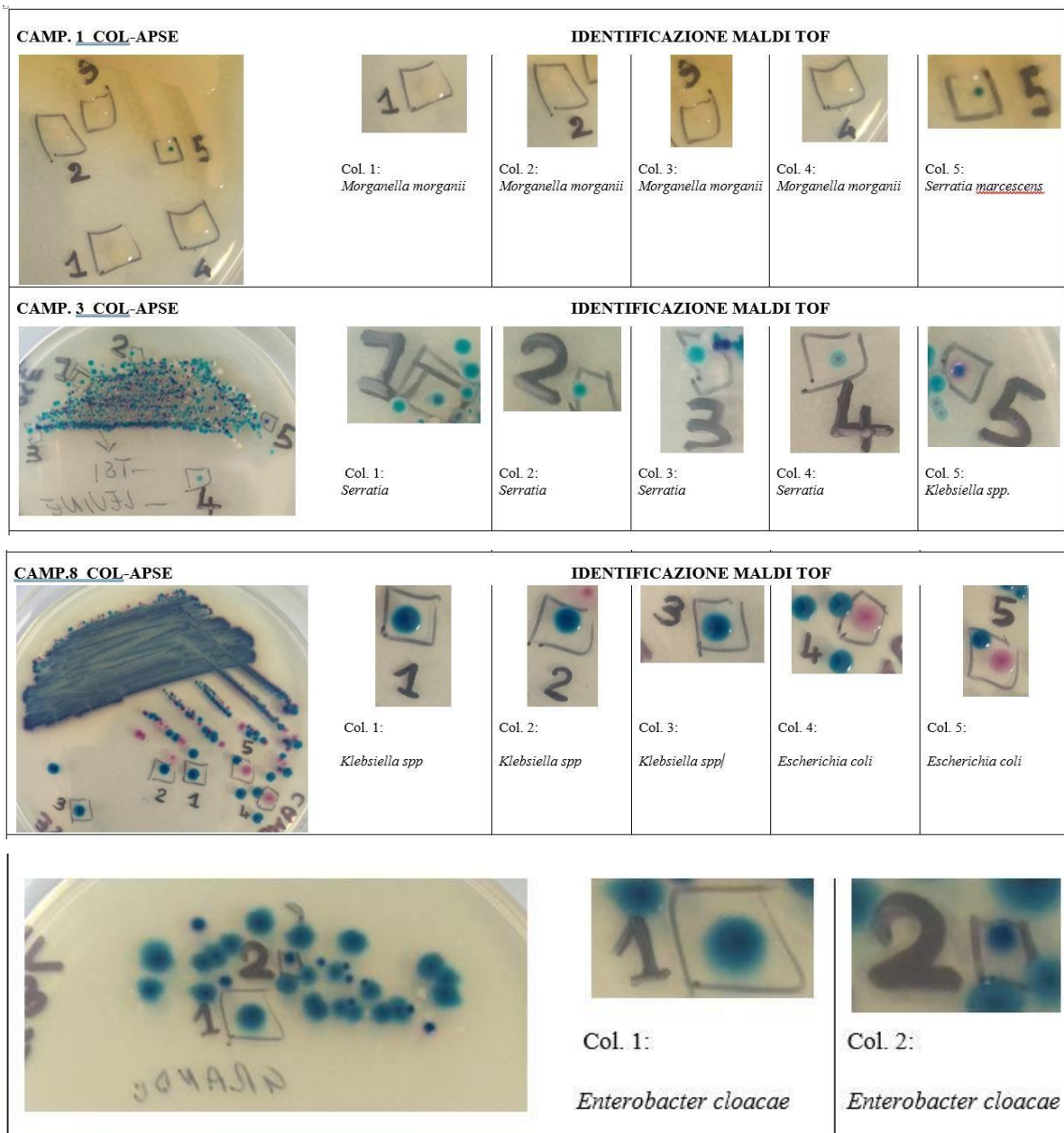


Figura 17. Aspetto delle colonie sul terreno CHROMAGAR COLAPSE, con la relativa identificazione eseguita mediante MALDI-TOF

8.3 Test di conferma

Gli isolati appartenenti alle specie intrinsecamente resistenti alla colistina come *Serratia marcescens*; *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* e gli isolati con resistenza intrinseca ai carbapenemi come *Stenothrophomonas maltophilia*, sono stati esclusi dalle indagini successive.

Tutti gli altri isolati sono stati sottoposti ai test di conferma per verificare l'effettiva resistenza alla colistina, ai carbapenemi e la produzione di ESBL.

Test di conferma per la resistenza alla colistina (COL R)

Le colonie di Enterobatteri isolate dal terreno CHROMAGAR COLA-PSE sono state sottoposte alla MIC per la colistina al fine di confermarne la resistenza. Sono stati confermati come Enterobatteri resistenti alla colistina 46 isolati. In particolare dai 500 campioni di alimenti crudi esaminati sono risultati positivi per presenza di enterobatteri resistenti alla colistina 25 alimenti da cui sono stati isolati 26 microrganismi (da un alimento una pasta fresca all'uovo sono stati isolati due diversi ceppi). I risultati sono in tabella 6. Dei 500 campioni di alimenti ready-to-eat esaminati sono risultati positivi per presenza di enterobatteri resistenti alla colistina 20 alimenti da cui sono stati isolati 20 microrganismi. I risultati sono in tabella 7.

Gli isolati che non hanno confermato la resistenza alla colistina sono stati esclusi dalle indagini successive.

Tabella 6. In tabella sono riportati gli alimenti crudi esaminati, i campioni positivi (numero e percentuale) per presenza di almeno un ceppo resistente alla colistina, le specie batteriche (identificate in silico) e la matrice alimentare di isolamento.

Alimento	N. di campioni	Numero di campioni positivi	Percentuale di campioni positivi per tipo di alimento (%)	N. di isolati	Organismo (n., nome dell'alimento)
Latte crudo	52	2	4	2	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1, latte di massa bovino) <i>Enterobacter mori</i> (1, latte di massa bovino)
Carni e derivati	207	11	5	11	<i>Enterobacter ludwigii</i> (1, carne bovina) <i>Enterobacter bugandensis</i> (1, tritato di manzo e suino) <i>Enterobacter kobei</i> (1, salsiccia fresca di suino, 1, impasto di salsiccia) <i>Enterobacter asburiae</i> (1, carne di suino) <i>Moellerella wisconsensis</i> (1, carne di bovino; 1, tritato di bovino; 1, salsiccia fresca di suino; 1, hamburger di suino e bovino; 1, carne di pollo) <i>Escherichia coli</i> (1, carne di tacchino)
Prodotti ittici	133	4	3	4	<i>Atlantibacter hermannii</i> (1, filetto di branzino) <i>Enterobacter hormaechei</i> (1, branzino) <i>Moellerella wisconsensis</i> (1, filetto di branzino) <i>Raoultella ornithinolytica</i> (1, vongole)
Prodotti da forno, pasticceria; pasta fresca	28	2	7	3	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1, pasta frolla cruda; 1, pasta fresca all'uovo*) <i>Enterobacter kobei</i> (1, pasta fresca all'uovo*) <small>*E. kobei and E. cancerogenus sono stati isolati dallo stesso campione di pasta fresca all'uovo</small>
Vegetali	80	6	8	6	<i>Enterobacter bugandensis</i> (1, bietole) <i>Enterobacter cloacae</i> (2, barattieri/carosello) <i>Enterobacter ludwigii</i> (1, sedano) <i>Enterobacter kobei</i> (1, sedano congelato) <i>Enterobacter cowanii</i> (1, grano sfarinato)
TOT	500	25	5	26	

Tabella 7. In tabella sono riportati gli alimenti ready-to-eat esaminati, i campioni positivi (numero e percentuale) per presenza di almeno un ceppo resistente alla colistina, le specie batteriche (identificate in silico) e la matrice alimentare di isolamento.

Alimento	N. di campioni	Numero di campioni positivi	Percentuale di campioni positivi per tipo di alimento (%)	N. di isolati	Organismo (n., nome dell'alimento)
Latte e derivati	240	9	4	9	<i>Enterobacter asburiae</i> (1, burrata) <i>Enterobacter kobei</i> (1, mozzarella; 1, formaggio caprino; 1, giuncata) <i>Enterobacter hormaechei</i> (1, mozzarella; 1, formaggio fresco; 1, giuncata) <i>Atlantibacter hermannii</i> (1, mozzarella; 1, formaggio fresco)
Derivati della carne	35	1	3	1	<i>Atlantibacter hermannii</i> (1, salsiccia stagionata)
Preparazioni gastronomiche	100	3	3	3	<i>Enterobacter ludwigii</i> (1, insalata condita da mensa) <i>Citrobacter freundii</i> (1, salmone grigliato) <i>Moellerella wisconsensis</i> (1, filetto di salmone impanato)
Prodotti da forno e di pasticceria	27	0	0	0	0
Gelati	66	5	8	5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1, gelato artigianale) <i>Enterobacter asburiae</i> (2, gelato artigianale) <i>Enterobacter hormaechei</i> (1, gelato artigianale) <i>Phytobacter diazotrophicus</i> (1, gelato artigianale)
Vegetali	32	2	6	2	<i>Klebsiella variicola</i> (1, insalata mista di IV gamma) <i>Enterobacter ludwigii</i> (1, macedonia)
TOT	500	20	4	20	

Test di combinazione: produzione di ESBL e AmpC

Le colonie isolate dal terreno CHROMAGAR ESBL sono state sottoposte al test di combinazione al fine di confermarne la produzione di enzimi ESBL.

Dei 500 campioni di alimenti crudi esaminati 29 (29/500; 6%) sono risultati positivi per la presenza di enterobatteri produttori di ESBL ed AmpC da cui sono stati isolati 31 microrganismi (da un campione di carne di pollo e da un tritato di tacchino sono stati isolati due diversi

microrganismi ciascuno). I risultati sono in tabella 8. Dei 500 campioni di alimenti rre esaminati sono risultati positivi per presenza di enterobatteri produttori di ESBL e di AmpC 12 alimenti da cui sono stati isolati 13 microrganismi (da un campione di gelato sono stati isolati due diversi microrganismi). I risultati sono in tabella 9.

Gli isolati che, al test di combinazione, non hanno confermato la produzione di Beta-lattamasi sono stati esclusi dalle indagini successive.

Tabella 8. In tabella sono riportati gli alimenti crudi esaminati, i campioni positivi (numero e percentuale) per presenza di almeno un ceppo produttore di ESBL e/o di AmpC, le specie batteriche (identificate in silico) e la matrice alimentare di isolamento.

Alimento	N. di campioni	Numero di campioni positivi	Percentuale di campioni positivi per tipo di alimento (%)	N. di isolati	Organismo (n., nome dell'alimento)
Latte	52	2	4	2	<i>Escherichia coli</i> (2, latte crudo da distributore automatico)
Carni e derivati	207	22	11	24	<p><i>Escherichia coli</i> (9, carne di pollo*; 1, tritato di tacchino**; 1, tritato di cavallo; 1, tritato di bovino e suino; 1, hamburger; 1, salsiccia fresca di pollo e tacchino)</p> <p><i>Salmonella enterica</i> (2, carne di pollo *)</p> <p><i>Enterobacter hormaechei</i> (1, salsiccia fresca di suino, 1, carne di pollo)</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> (1, tritato di tacchino**; 2, carne di tacchino; 1, salsiccia fresca di suino; 1, tritato di suino e bovino; 1, carne di suino)</p> <p>*1 <i>E. coli</i> e 1 <i>Salmonella enterica</i> sono stati isolati dallo stesso campione di carne di pollo;</p> <p>**1 <i>E. coli</i> e 1 <i>K. pneumoniae</i> sono stati isolati dallo stesso campione di tritato di tacchino</p>
Prodotti ittici	133	2	2	2	<p><i>Escherichia coli</i> (1, cozze)</p> <p><i>Enterobacter hormaechei</i> (1, anelli di totano congelati)</p>
Prodotti da forno, di pasticceria; pasta fresca	28	2	7	2	<p>(n.=1) <i>Escherichia coli</i> (1, pasta fresca all'uovo)</p> <p>(n.=1) <i>Enterobacter kobei</i> (1, pasta fresca all'uovo)</p>
Vegetali	80	1	1	1	(n.=1) <i>Enterobacter ludwigii</i> (1 patate)
TOT	500	29	6	31	

Tabella 9. In tabella sono riportati gli alimenti ready-to-eat esaminati, i campioni positivi (numero e percentuale) per presenza di almeno un ceppo produttore di ESBL e/o di AmpC, le specie batteriche (identificate in silico) e la matrice alimentare di isolamento.

Alimento	N. di campioni	Numero di campioni positivi	Percentuale di campioni positivi per tipo di alimento (%)	N. di isolati	Organismo (n., nome dell'alimento)
Latte e derivati	240	8	3	8	<i>Enterobacter hormaechei</i> (3, mozzarella; 1, caciocotta; 1, scamorza; 1, ricotta)
					<i>Escherichia coli</i> (1, canestrello cheese)
					<i>Citrobacter braaki</i> (1, mozzarella)
Derivati della carne	35	0	0	0	0
Preparazioni gastronomiche	100	0	0	0	0
Prodotti da forno e di pasticceria	27	1	4	1	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1, dolce alla crema)
Gelati	66	2	3	3	<i>Klebsiella variicola</i> (1, gelato artigianale)
					* <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter hormaechei</i> (n.1, gelato confezionato)
* dallo stesso campione di gelato sono stati isolati <i>E.coli</i> e <i>E. hormaechei</i>					
Vegetali	32	1	3	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1, insalata IV gamma)
TOT	500	12	2	13	

Test di conferma resistenza ai carbapenemi e produzione di carbapenemasi

Le colonie isolate dal terreno CHROMAGAR mSuperCarba sono state sottoposte nella stessa seduta di analisi al test Kirby Bauer per verificare la resistenza agli antibiotici carbapenemi e al test di sinergia per verificare la produzione di carbapenemasi.

Nessun isolato si è confermato resistente ai carbapenemi e produttore di carbapenemasi. Solo un isolato di *Moellerella wisconsensis* ESBL091 resistente alla colistina ed uno di *E.*

hormaechei ESBL129 produttore di AmpC, avevano una sensibilità Intermedia all'imipenem e all'ertapenem, rispettivamente.

8.4 Test di sensibilità agli antibiotici Minima Concentrazione Inibente

In totale 90 isolati, appartenenti a diverse specie (tabelle 6,7,8,9), sono risultati positivi ai test di conferma e quindi realmente resistenti alla colistina e/o produttori di ESBL e/o di AmpC. Tutti sono stati esaminati con il metodo della MIC nei confronti di 12 classi di antibiotici.

Le specie, la matrice alimentare da cui sono stati isolati e il profilo di antibiotico-resistenza è mostrato nelle tabelle 10, 11 e 12.

I risultati del test della MIC relativi ai 41 *Enterobacter* spp. (12 isolati da alimenti RTE e 29 da alimenti crudi) che erano risultati positivi ad almeno un test di conferma, sono mostrati in tabella 10. Di questi, 28 isolati erano resistenti alla colistina, tra cui 3 erano anche produttori di AmpC ed uno anche produttore di ESBL/AmpC. Altri 11 *Enterobacter* spp. erano produttori di AmpC e 2 erano produttori di ESBL/AmpC. Tutti hanno mostrato resistenza intrinseca a AMP, AUG2, A/S2, FAZ, FOX. E tutti erano MDR perché presentavano la resistenza da un minimo di 4 classi di antibiotici ad un massimo di 9 (*E. kobei* ESBL121).

Tabella 10. Profilo AMR degli isolati di *Enterobacter* spp. In grigio è indicato il decremento del valore di MIC della combinazione F/C, T/C rispetto all'antibiotico da solo FOT e TAZ ed indica la produzione di ESBL. In rosso è indicata la resistenza all'antibiotico; in giallo la resistenza intrinseca; in arancione la sensibilità Intermedia.

Gli asterischi*indicano che si tratta di un alimento da cui è stato isolato più di un ceppo batterico

Alimento di isolamento	Specie	ID	Penicillins		β-lactam combination agents	Macrolides	Aminoglycosides	Phenolics	Fluoroquinolones	Cepheims (Cephalosporins I *)	Cepheims (Cephalosporins II *)	Cepheims (Cephalosporins III *)	Cepheims (Cephalosporins IV *)	Tetracyclines	Sulfonamides	Monobactam	Penems (Carbapenems)	Lipopeptides (Polymyxins)	TEST di COMBINAZIONE	Ceppi Colistino Resistenti (COL R); produttori di AmpC e/o ESBL													
			AMP - Ampicillin	PIP - piperacillin																	AUG2 - Amoxicillin / Clavulanic acid	AUG2 - Ampicillin / Sulbactam	P/T4 - Piperacillin/Tazobactam	T/M2 - Ticarcillin/Clavulanic acid	AZL - Azithromycin	AMK - Amikacin	GEN - Gentamicin	STR - Streptomycin	TOB - Tobramycin	CHL - Chloramphenicol	CFP - Ciprofloxacin	LEVO - Levofloxacin	NAL - Nalidixic Acid
carne di bovino	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ESBL026																															
carne suina	<i>Enterobacter asburiae</i>	ESBL027																															
latte di massa bovino	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL034																															
latte di massa bovino	<i>Enterobacter mori</i>	ESBL045																															
bietole	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ESBL050																															
barattieri/carosello	<i>Enterobacter cloacae</i>	ESBL051																															
mozzarella	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL056																															
mozzarella	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL057																															
salsiccia fresca di suino	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL060																															
tritato bov/suino	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ESBL071																															
formaggio fresco	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL072																															
formaggio ovicaprino	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL074																															
sedano	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ESBL076																															
sedano a cubetti III gamma	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL077																															
carosello	<i>Enterobacter cloacae</i>	ESBL079																															
macedonia	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ESBL080																															
insalata condita	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ESBL081																															
gelato artigianale	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL084																															
impasto di salsiccia	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL085																															
spigola cruda	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL086																															
gelato artigianale	<i>Enterobacter asburiae</i>	ESBL112																															
gelato artigianale	<i>Enterobacter asburiae</i>	ESBL113																															
burrata	<i>Enterobacter asburiae</i>	ESBL120																															
pasta fresca all'uovo	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL121																															
giuncata	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL122																															
giuncata	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL123																															
pasta frolla cruda	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	ESBL127																															
***pasta fresca all'uovo	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	ESBL140																															
salsiccia fresca suino	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL007																															
mozzarella	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL022																															
caciocotta	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL023																															
scamorza	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL033																															
patate	<i>Enterobacter ludwigii</i>	ESBL078																															
mozzarella	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL096																															
carne di pollo	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL100																															
bigné alla crema	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL116																															
mozzarella	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL124																															
ricotta	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL129																															
anelli di totano crudi	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL134																															
***gelato confezionato	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ESBL139																															
***pasta fresca all'uovo	<i>Enterobacter kobei</i>	ESBL141																															

I risultati della MIC, relativi ai 21 *Escherichia coli* (2 isolati da alimenti rte e 19 da alimenti crudi) che sono risultati positivi ad almeno un test di combinazione, sono mostrati in tabella 11. Uno degli isolati era resistente alla colistina e produttore di Beta-Lattamasi, 18 erano produttori di ESBL e 2 erano produttori di ESBL/AmpC. Tutti erano MDR perché presentavano la resistenza da un minimo di 4 classi di antibiotici ad un massimo di 9 (ESBL032 e ESBL107).

I risultati relativi agli 8 isolati di *K. pneumoniae* (2 isolati da alimenti rte e 6 da alimenti crudi) e i 2 di *K. variicola* (isolate da due alimenti rte) che sono risultati positivi ad almeno un test di combinazione, sono mostrati in tabella 11. Per quanto riguarda gli isolati di *K. pneumoniae*, uno era resistente alla colistina e produttore di ESBL, mentre 7 erano produttori di ESBL. I due isolati di *K. variicola* erano uno resistente alla colistina e l'altro produttore di AmpC. Tutti gli isolati di *Klebsiella* spp. mostravano la resistenza intrinseca all'ampicillina. Gli 8 ceppi di *K. pneumoniae* e 1 di *K. variicola* erano MDR perché presentavano la resistenza da un minimo di 3 classi di antibiotici ad un massimo di 8 (ESBL061, ESBL064, ESBL070 e ESBL082).

I risultati relativi a due ceppi di *Salmonella enterica* (isolati da alimenti crudi), sono mostrati in tabella 11. Erano entrambi produttori di ESBL ed anche MDR perché presentavano resistenza a 6 classi di antibiotici.

I risultati relativi ad un *Citrobacter freundii* (isolato da alimento crudo) resistente alla colistina e un *C. braakii* (isolato da rte) produttore di AmpC, sono mostrati in tabella 11. Erano entrambi MDR perché presentavano resistenza a 6 e 4 classi di antibiotici, rispettivamente.

pronti al consumo (rte). Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($P > 0,05$).

L'antibiotico che mostrava una maggiore percentuale di ceppi resistenti era l'ampicillina (91%), seguito dalla cefazolina (86%), l'ampicillina/sulbactam (73%) gli altri avevano percentuali più basse (figura 18).

Il 51% dei ceppi isolati era resistente alla colistina. Un isolato di *E. kobei* ed uno di *M. wisconsensis* mostravano una resistenza intermedia ai carbapenemi ertapenem ed imipenem. Il 38% (34/90) dei ceppi era produttore di ESBL.

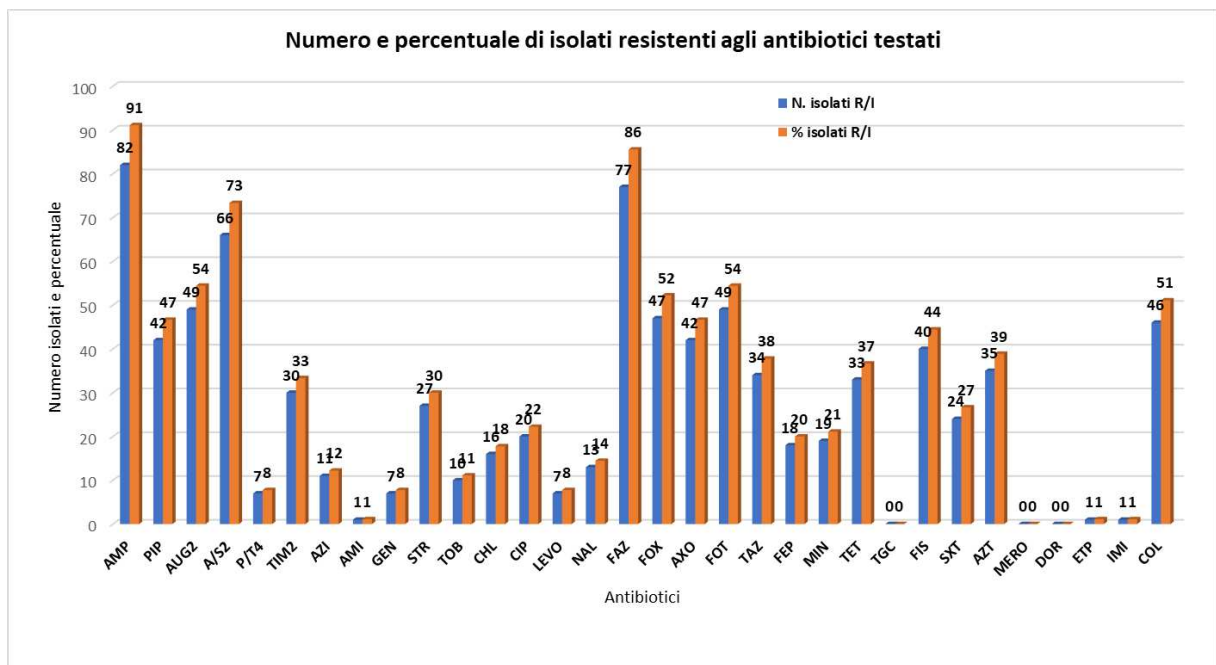


Figura 18. Numero e percentuale della resistenza (R) e della sensibilità intermedia (I) agli antibiotici esaminati dei 90 ceppi di Enterobatteri isolati

Nelle figure che seguono sono mostrate le percentuali di resistenza agli antibiotici dei ceppi resistenti alla colistina (figura 19) e di quelli produttori di ESBL e/o AmpC (figura 20). Da cui

si evidenziano delle percentuali di resistenza più alte non solo per le cefalosporine, ma anche per le altre classi di antibiotici tra i ceppi produttori di ESBL (figura 20) rispetto a quelli resistenti alla colistina (figura 19).

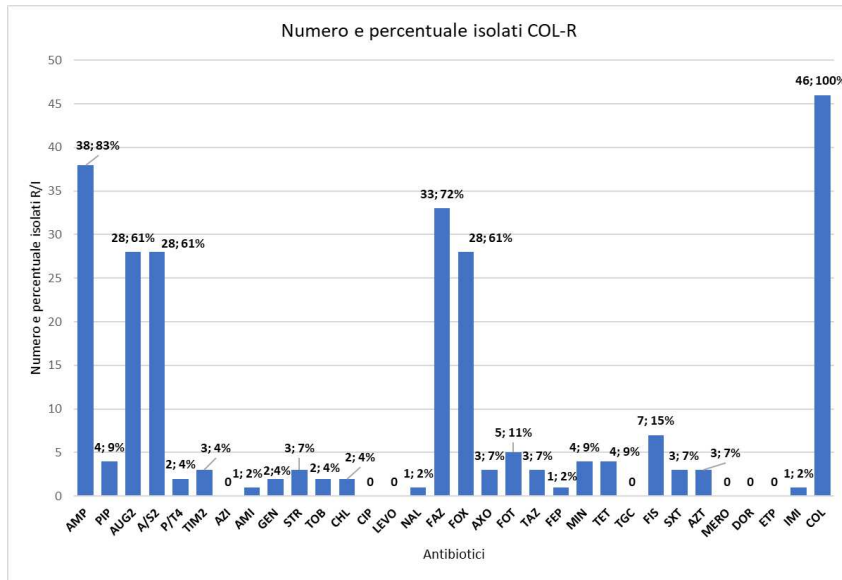


Figura 19. Numero e percentuale di ceppi, isolati come resistenti alla colistina, resistenti ai 32 antibiotici testati

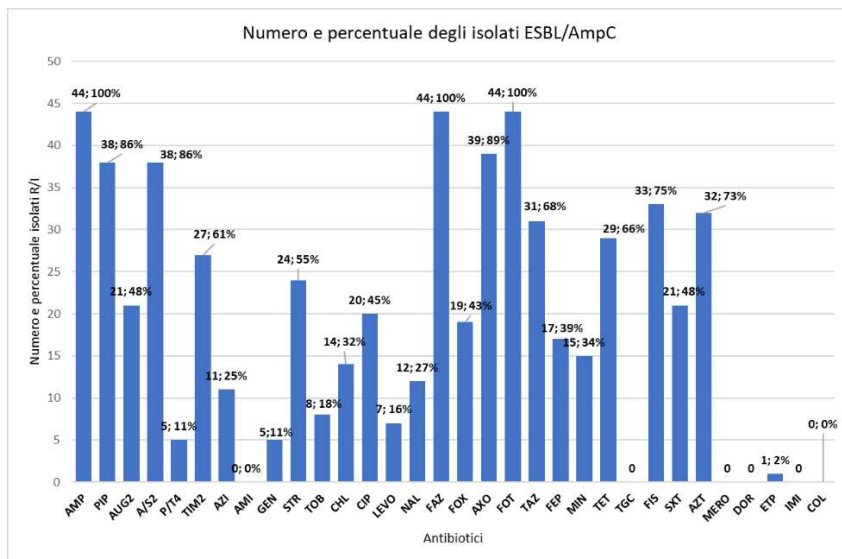


Figura 20. Numero e percentuale di ceppi, isolati come ESBL o AmpC, resistenti ai 32 antibiotici testati

8.5 Geni antibiotico-resistenza, virulenza e plasmidi (WGS)

Sono stati prodotti 90 dataset WGS relativi ad altrettanti isolati. La dimensione media dei dataset di sequenziamento è stata di 700.000 reads per campione. I dataset sono stati analizzati mediante assemblaggio dei genomi e annotazione tassonomica e funzionale. I valori di completezza (>95%) e contaminazione (<5%) dei genomi assemblati ne hanno supportato la possibilità di ottenere annotazioni funzionali e tassonomiche di alta qualità. L'assegnazione tassonomica dei genomi assemblati in silico sono sempre risultate in accordo con le analisi microbiologiche eseguite tramite MALDI-TOF.

L'annotazione funzionale dei geni predetti ha individuato i geni che conferiscono resistenza a diversi antibiotici (tabelle 14 e 15).

I 46 ceppi resistenti alla colistina presentavano un totale di 51 diversi geni AMR (ARGs) che sono stati divisi in 14 gruppi: geni che conferiscono resistenza alla colistina (*mcr*), geni che codificano le Beta-lattamasi di classe C (AmpC), geni delle Beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), geni delle Beta-lattamasi a spettro ristretto (Narrow-spectrum beta-lactamase) (NSBL), geni delle Beta-lattamasi ad ampio spettro (Broad-spectrum beta-lactamase) (BSBL), geni della resistenza agli amminoglicosidi (A), ai cloramfenicoli (CHL), ai chinoloni (Q), ai macrolidi (M), ai trimetoprim (TRI), ai sulfonamidi (SUL), alla tetraciclina (TET), geni delle pompe di efflusso che conferiscono multi-resistenze (PE) e geni della resistenza alla fosfomicina (FOS). Tra le classi identificate, i geni delle β -lattamasi sono risultati i più abbondanti, rilevati in 37 ceppi (37/46; 80%). È interessante notare che due geni SHV-145 e

SHV-12 e due geni TEM- 1A e TEM-1B, associati alle beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e alle beta-lattamasi ad ampio spettro (BSBL), rispettivamente, sono stati trovati in tre ceppi (ESBL39, ESBL121 e ESBL75) colistino-resistenti. Sette ceppi presentavano i geni *mcr-1*, *mcr-9* e *mcr-10*, mediati da plasmidi, che conferiscono resistenza alla colistina. Inoltre, sono stati identificati geni di resistenza agli amminoglicosidi, cloramfenicoli, macrolidi, fluorochinoloni, sulfonamidi e tetracicline (Tabella 14).

È stata rilevata una concordanza del 100% tra genotipo e fenotipo (entrambi positivi) per i 37 ceppi che possedevano almeno un gene che conferisce resistenza ai Beta-lattamici, per i 5 isolati che avevano i geni della resistenza ai sulfonamidi e per i 4 ceppi con i geni della resistenza alle tetracicline.

In figura 21 è riportato il numero dei geni suddivisi in classi di resistenza antimicrobica; da notare che ci sono isolati che possiedono più di un gene appartenente alla stessa classe.

I geni più numerosi sono quelli delle pompe di efflusso (N.=60), seguiti dai geni delle Beta-lattamasi (N.= 39).

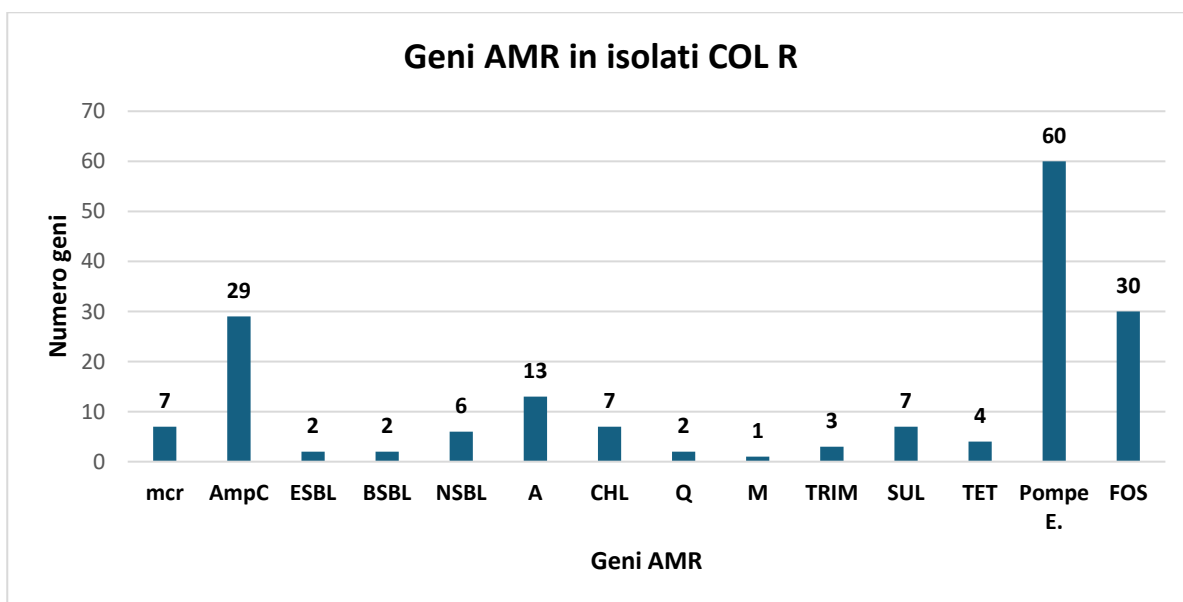


Figura 21. Numero di geni AMR in 46 isolati colistino-resistenti compresi i tre ceppi anche produttori di ESBL. I geni riuniti in classi sono indicati con le seguenti sigle: mcr; AmpC Beta-lattamasi classe C; ESBL Beta-lattamasi a spettro esteso; BSBL Beta -lattamasi ampio spettro; NSBL Beta-lattamasi a spettro ristretto; A Amminoglicosidi; CHL cloramfenicoli; Q Chinoloni; M Macrolidi; TRIM Trimetoprim; SUL Sulfonamidi; TET Tetracicline; Pompe E. Pompe di efflusso; FOS Fosfomicina.

I geni AMR (ARGs) rilevati nei 44 ceppi isolati come produttori di ESBL/AmpC sono stati divisi in 14 classi di resistenza antimicrobica: geni che codificano le Beta-lattamasi di classe C (AmpC), geni delle Beta-lattamasi ESBL (ESBL), geni delle Beta-lattamasi a spettro ristretto (NSBL) e ad ampio spettro (BSBL), geni della resistenza agli amminoglicosidi (A), ai cloramfenicoli (CHL), ai chinoloni (Q), ai macrolidi (M), al trimetroprim (TRI), ai sulfonamidici (SUL), alla tetraciclina (TET), geni delle pompe di efflusso che conferiscono multi-resistenze (PE), geni della resistenza alla fosfomicina (FOS) e della resistenza alla lincomicina (LIN).

Tra le classi identificate, i geni delle β -lattamasi sono risultati più abbondanti, rilevati in tutti i 44 ceppi (100%); tra questi 32 isolati presentavano almeno uno dei tre geni ESBL (*blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*). Sono stati identificati geni di resistenza agli amminoglicosidi, cloramfenicoli, macrolidi, fluorochinoloni, sulfonamidi, tetracicline, lincomicina, fosfomicina e pompe di efflusso (Tabella 15).

È stata rilevata una concordanza del 100% tra genotipo e fenotipo (entrambi positivi) in tutti i ceppi per la resistenza ai Beta-lattamici.

In figura 22 è riportato il numero dei geni suddivisi in classi di resistenza antimicrobica; da notare che ci sono isolati che possiedono più di un gene appartenente alla stessa classe.

In questo gruppo di isolati i geni più numerosi erano quelli che codificano le Beta-lattamasi con 72 geni. Tra questi, 52 erano i geni delle Beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) (figura 23).

In questi isolati sono più numerosi anche i geni che conferiscono resistenza agli amminoglicosidi, trimetoprim, sulfonamidi e tetracicline (figura 22).

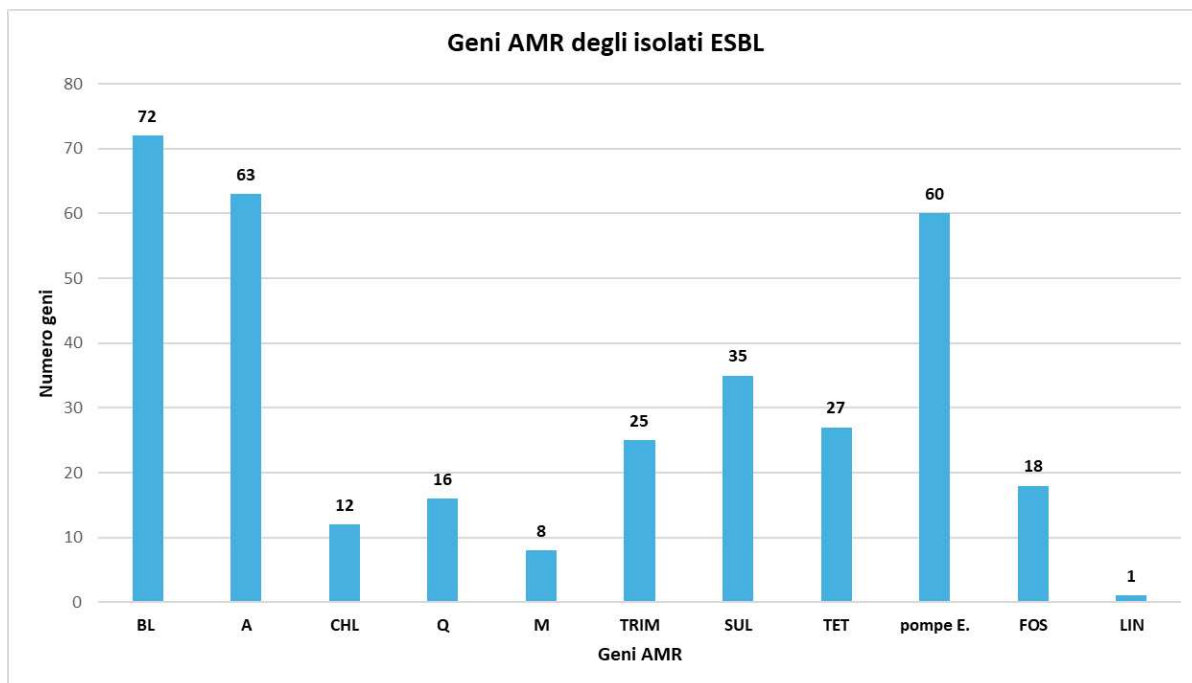


Figura 22. Numero di geni AMR nei 44 ceppi isolati come produttori di ESBL/AmpC. I geni riuniti in classi sono indicati con le seguenti sigle: BL: Beta -lattamasi; A: Amminoglicosidi; CHL: cloramfenicoli; Q: Chinoloni; M: Macrolidi; TRIM Trimetoprim; SUL: Sulfonamidi; TET: Tetracicline; Pompe E: Pompe di efflusso; FOS: Fosfomicina; LIN: Lincomicina

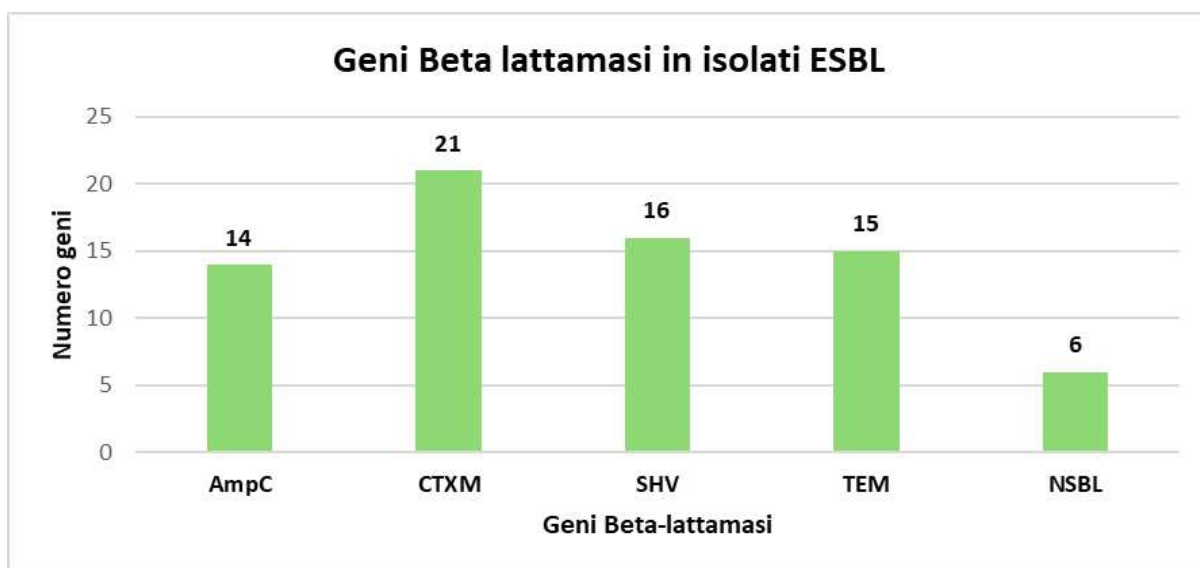


Figura 23. Numero dei (72) geni BL dei 44 isolati ESBL/AmpC, suddivisi per gruppi di enzimi AmpC, ESBL (CTXM, SHV, TEM) e NSBL (Beta-lattamasi a spettro ristretto)

Nella figura 24 è indicato il numero totale, e la loro percentuale, dei geni suddivisi in classi di resistenza antimicrobica di tutti i 90 ceppi isolati. Ci sono isolati che possiedono più di un gene appartenente alla stessa classe.

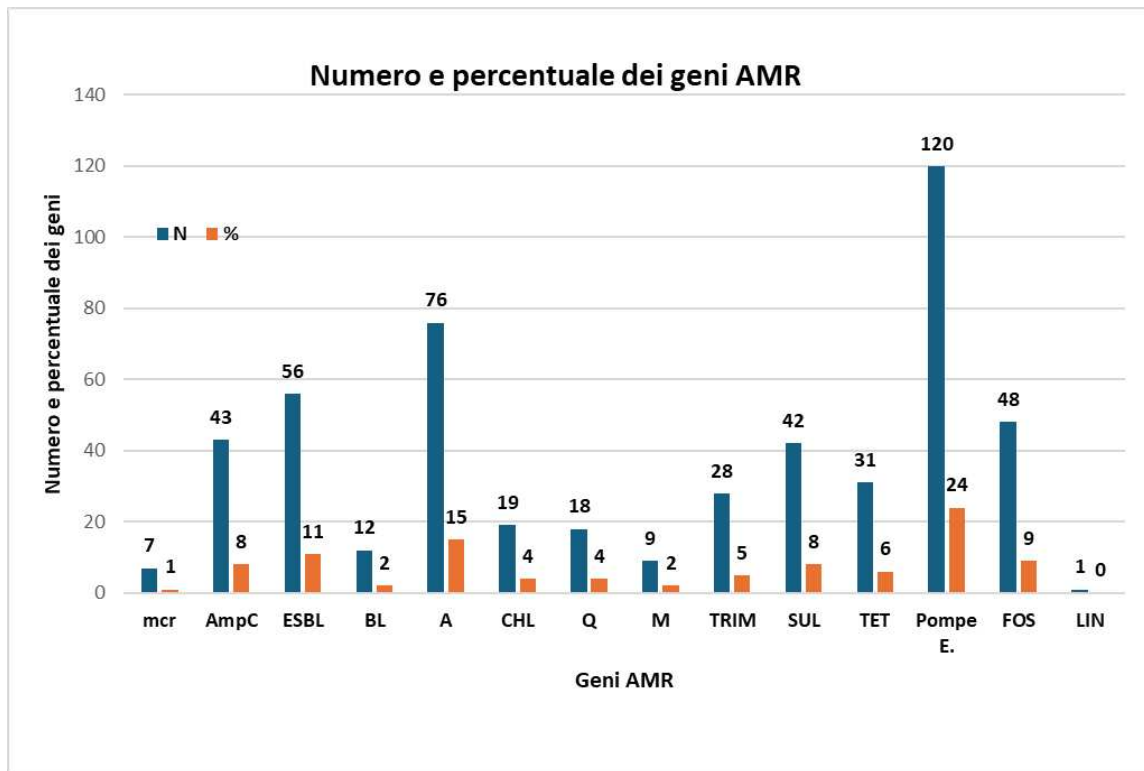


Figura 24. Numero e percentuale dei geni AMR nei 90 ceppi isolati

I geni più abbondanti sono quelli che codificano per la pompa di efflusso OqxAB. In particolare i due geni *oqxA* e *oqxB* codificano per due proteine *oqxA* e *oqxB* del sistema di efflusso e sono stati rilevati in 50 isolati. Questa pompa di efflusso ha un ruolo importante nella resistenza batterica, poiché espelle attivamente una varietà di agenti antimicrobici e altre sostanze tossiche dalla cellula batterica. È stato scoperto inizialmente in *Escherichia coli*, ma è presente anche in altri batteri Gram-negativi. È associata a resistenza MDR, infatti contribuisce alla resistenza

contro diversi antibiotici, tra cui chinoloni, cloramfenicolo e trimetoprim. Inoltre questi due geni possono essere trasportati su plasmidi. Ai geni *oqxAB* si aggiunge il gene di un'altra pompa di efflusso *mdfA* presente in 20 isolati (tutti *E. coli*) e anche questa in grado di conferire MDR. Insieme rappresentano il 24% dei geni ARGs rilevati. Segue la classe dei geni che conferiscono resistenza agli antibiotici Beta-lattamici (NSBL, AmpC, ESBL) insieme rappresentano il 22% (111/510) dei 510 ARGs rilevati.

In particolare, in tutti gli *Enterobacter* spp. (tabelle 14 e 15) è stato rilevato almeno un gene *blaACT* o *blaCMH*; i 2 *Citrobacter* spp. possiedono entrambi il gene *blaCMY*; i 4 *Atlantibacter hermannii* hanno tutti il gene *blaHERA*; tutti gli isolati produttori di ESBL hanno almeno uno dei geni *blaCTXM*, *blaSHV* e *blaTEM*. Tredici isolati possedevano i geni *CTXM-14* e *CTXM-15*. È interessante notare che tre ceppi (ESBL39, ESBL75 e ESBL121) resistenti alla colistina possedevano i geni *blaSHV* e *blaTEM*.

Sette ceppi presentavano geni mediati da plasmidi *mcr-1*, *mcr-9* e *mcr-10*, che conferiscono resistenza alla colistina. Inoltre, sono stati identificati geni di resistenza agli amminoglicosidi, cloramfenicoli, macrolidi, fluorochinoloni, sulfonamidi e tetracicline (Tabella 14).

In accordo con le analisi microbiologiche, in nessun isolato sequenziato è stato riscontrato alcun gene codificante carbapenemasi di classe A (*blaGES*), di classe D (*blaOXA-198*) o MBL (*blaVIM*, *blaIMP*, *blaGIM*).

Geni Virulenza

Per quanto riguarda i fattori di virulenza, la predizione dei geni di virulenza è stata effettuata utilizzando il Virulence Factors Database (VFDB) e i risultati sono riportati nella Tabella

Supplementare S1. In totale, negli isolati sono stati rilevati 204 geni di virulenza implicati in diversi meccanismi di virulenza e patogenicità. Indipendentemente dalla specie del ceppo, il gene più frequentemente rilevato (92%; 83/90) è stato *ompA*, che codifica per una proteina di membrana esterna che contribuisce all'invasione cellulare e favorisce l'evasione del sistema immunitario proteggendo i batteri dal sistema del complemento e dalla fagocitosi. Altro gene frequente è *csgG* (70%;63/90) componente chiave del sistema di produzione di fimbrie di tipo curli, una struttura extracellulare filamentosa prodotta da alcuni batteri Gram-negativi. Le fimbrie di tipo curli sono coinvolte nell'adesione alle superfici, nella formazione di biofilm e nella virulenza. Il numero di geni di virulenza per ceppo è riportato nella Figura 25.



Figura 25. Numero dei geni della virulenza nei 90 ceppi isolati e suddivisi in resistenti alla colistina; produttori di AmpC e ESBL; resistenti alla colistina e produttori di ESBL e BSBL.

Le specie con il maggior numero di geni della virulenza erano i due isolati di *Salmonella enterica* con 117 VGs ed i 21 isolati di *E. coli* (tutti produttori di Beta-lattamasi) con un massimo di 84 VGs del ceppo colistino-resistente ad un minimo di 37 geni nei restanti *E. coli*. Nei restanti isolati sono stati rilevati da un massimo di 20 geni a nessun VG nei 7 ceppi di *Moellerella wisconsensis*. I 41 *Enterobacter* spp. presentavano da 2 a 7 geni della virulenza fanno eccezione i due *E. cancerogenus* che ne avevano 14 (figura 25).

Plasmidi

La predizione dei tipi di plasmidi tra i ceppi è stata realizzata utilizzando PlasmidFinder, e i risultati sono riportati nella Tabella 16 per i ceppi colistino-resistenti e in Tabella 17 per i ceppi isolati come produttori di ESBL/AmpC.

Tabella 16. Plasmidi nei 44 ceppi isolati come resistenti alla colistina

ID	Col(MG 828)_1	Col(MGD2)_1	Col(Y e4449)_1	Col156_1	Col3M_1	ColE 10_1	ColR NA L_1	ColpVC_1	IncFIA (HI1)_1_HI1	IncFIB(A P 001918)_1	IncFIB(K)_1_K_pn3	IncFIB(pB171)_1_pB171	IncFIB(pE CLA)_1_pE CLA	IncFIB(pHCM2)_1_pHCM2	IncFIB(pQ1)_1_pQ1	IncFIC(FII)_1	IncFIS_1	IncFII(Y p)_1_Y ersenia	IncFII(p14)_1_p14	IncFII(pCRY)_1_pCRY	IncFII(pE CLA)_1_pE CLA	IncFII_1_pK P91	IncH11A_1	IncH11B(CIT)_1_pNDM -CIT	IncH11B(R 27)_1_R 27	IncH12A_1	IncH12_1	IncN_1	IncQ_1_1	IncR_1	IncX 5_1	IncX 6_1	pENT AS 02_1	pESA Z_1	T rFA_1					
ESBL026							1						1																											
ESBL027							1					1																	1											
ESBL034							1																																	
ESBL037					1																																			
ESBL039							1					1																												
ESBL045							1																																	
ESBL050																																								
ESBL051													1																											
ESBL056							1		1		1																													
ESBL057							1	1			1			1																										
ESBL059																																								
ESBL060							1		1		1																													
ESBL071																																								
ESBL072		1	1				1	1					1																											
ESBL073							1																																	
ESBL074													1																											
ESBL075	1									1																														
ESBL076																																								
ESBL077					1			1																																
ESBL079																																								
ESBL080																																								
ESBL081																																								
ESBL084																																								
ESBL085								1			1			1																										
ESBL086																																								
ESBL089							1																																	
ESBL090								1		1	1																													
ESBL091							1																																	
ESBL092							1	1																																
ESBL093																																								
ESBL094																																								
ESBL112								1					1																											
ESBL113								1					1																											
ESBL114																																								
ESBL115																																								
ESBL118		1	1					1	1																															
ESBL120								1					1																											
ESBL121								1					1																											
ESBL122								1					1																											
ESBL123								1					1																											
ESBL126								1																																
ESBL127													1																											
ESBL128								1	1																															
ESBL128								1	1																															
ESBL131								1																																
ESBL132																																								
ESBL140																																								

identificato in 15 ceppi (figure 26 e 27). Inoltre, in un ceppo (ESBL096) è stato individuato il maggior numero di tipi di repliconi (n=12), mentre quindici ceppi non presentavano alcun replicone (figura 28).

Tuttavia, va specificato che nei ceppi analizzati non è stato possibile identificare l'intera sequenza nucleotidica dei plasmidi, ma solo frammenti che il database ha riconosciuto come riconducibili a plasmidi.

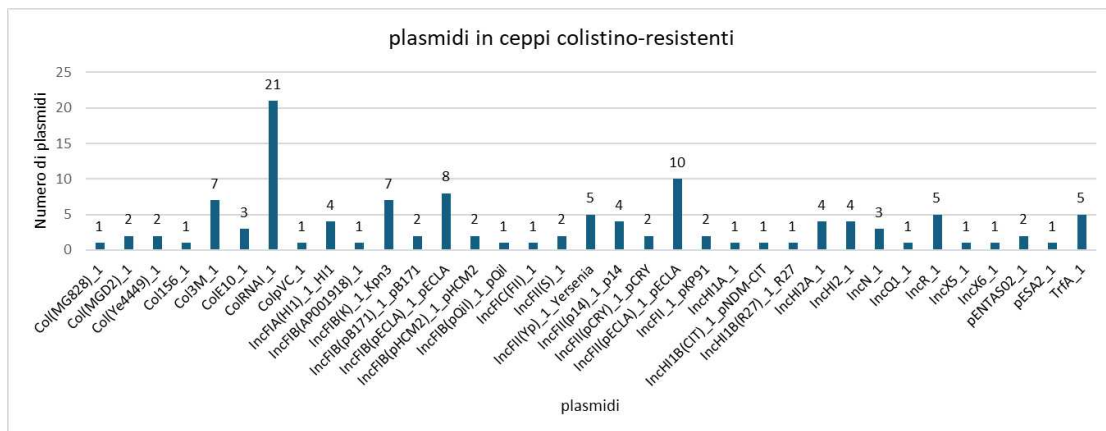


Figura 26. Tipologie e numero di plasmidi nei ceppi isolati come resistenti alla colistina

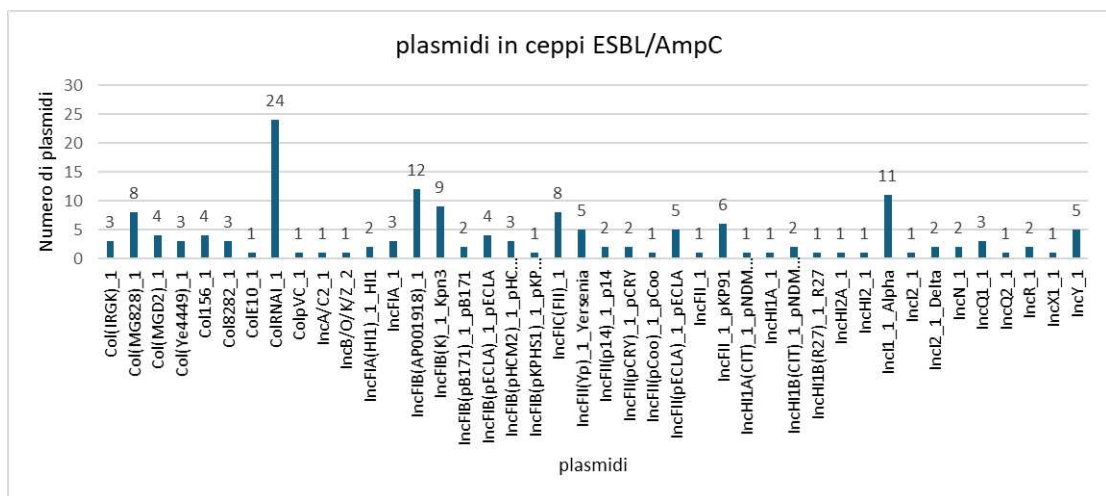


Figura 27. Tipologie e numero di plasmidi nei ceppi isolati come produttori di ESBL/AmpC

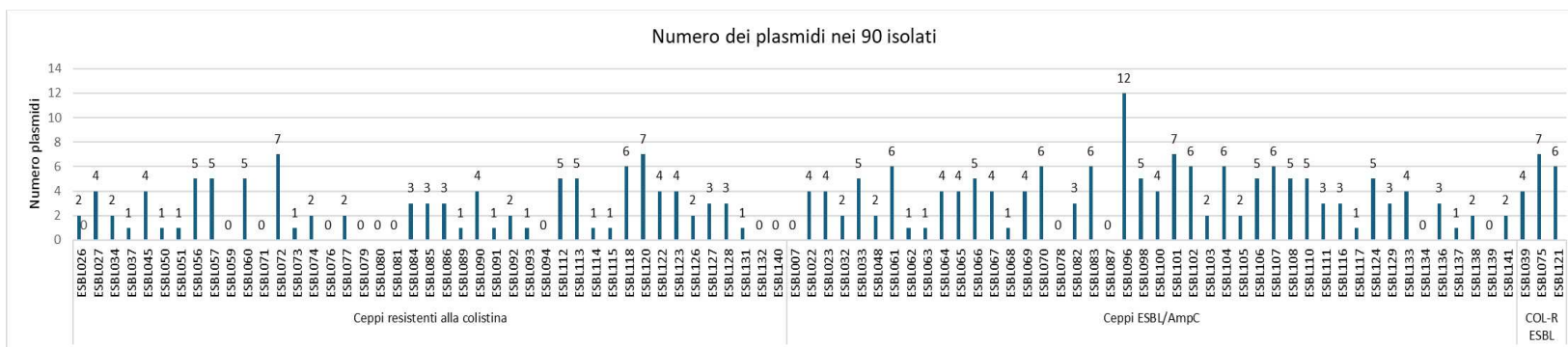


Figura 28. Numero di plasmidi presenti in ciascuno dei 90 ceppi isolati

9. DISCUSSIONE

La World Health Organisation (WHO) ha classificato come critici (CIA, Critically Important Antimicrobials) alcuni principi attivi indispensabili per la cura di importanti infezioni umane, la cui efficacia terapeutica dev'essere preservata nel tempo. Tra questi troviamo i carbapenemi, antibiotici di ultima linea, utilizzati solo per infezioni gravi nell'uomo; la colistina un antibiotico usato come ultima risorsa per trattare infezioni causate da batteri multiresistenti; le cefalosporine di terza e quarta generazione usate per trattare infezioni gravi e anche queste critiche per l'uomo. All'interno della lista CIA, questi antibiotici sono classificati come Highest Priority Critically Important Antimicrobials (HstPCIA), quindi principi attivi con il più alto grado di criticità. La presenza, negli alimenti, di batteri resistenti a questi antibiotici è un esempio concreto di come la resistenza antimicrobica sia una minaccia globale. In quanto questi batteri possono colonizzare gli esseri umani attraverso il consumo di alimenti contaminati e i geni della resistenza antimicrobica possono passare da un batterio all'altro anche di specie diverse. Inoltre i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* sono spesso associati a infezioni nosocomiali o acquisite in comunità, tra cui polmonite, batteriemia, infezioni delle vie respiratorie, urinarie o addominali e altre (Chang *et al.*, 2021). Enterobatteri multi-resistenti (MDR), resistenti alla colistina, ai carbapenemi e produttori di ESBL sono in aumento (van Duijn *et al.*, 2011).

Il presente lavoro ha riguardato lo studio della presenza, in 1.000 campioni di alimenti di origine animale e vegetale, di ceppi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi, alla colistina e produttori di enzimi ESBL in grado di conferire resistenza a

numerosi antibiotici utilizzati in medicina umana e veterinaria come penicilline, cefalosporine anche di terza e quarta generazione e monobattami.

Nel presente lavoro in nessun alimento sono stati isolati ceppi produttori di carbapenemasi, ma solo due isolati avevano una sensibilità intermedia a ertapenem e imipenem.

L'8,6% (86/1.000) degli alimenti era positivo per la presenza di isolati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* resistenti alla colistina, e/o produttori di ESBL ed AmpC. Tra questi il 3,2% erano alimenti ready-to-eat e il 5,4% erano alimenti crudi. Uno studio recente (Lencina *et al.*, 2024) riportava che la prevalenza di alimenti contaminati da *E. coli* resistenti alla colistina era del 4.79%. Nello stesso studio la più alta prevalenza era stata trovata in America Latina (3.24%), Asia (8.67%) e Africa (5.04%); più bassa era osservata in Europa (1.87%) e Nord America (2.05%). In uno studio (Ojer-Usoz *et al.*, 2017) condotto in Spagna, su 580 campioni di alimenti tra cui verdure, formaggi, pesce, carni cotte e prodotti a base di carne fresca di manzo, pollame e maiale, la percentuale di campioni positivi per presenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL era del 19.3% (56,8% nei campioni di carne, 4,6% nei vegetali e 2,7% nei prodotti della pesca e carni cotte, ma 0% nei formaggi). In un altro lavoro (Randall *et al.*, 2017), in Gran Bretagna, 1,9% e 2,5% dei campioni di carne di bovino e di maiale, rispettivamente, era positivo per la presenza di *E. coli* produttori di ESBL.

Nel presente lavoro sono stati isolati, in totale, 90 ceppi da 86 alimenti (da una carne di pollo, da un tritato di tacchino, da una pasta fresca all'uovo e da un gelato sono stati isolati due ceppi ciascuno). Il genere isolato con maggiore frequenza è stato *Enterobacter* spp. (46%; 41/90), seguito da *Escherichia coli* (23%; 21/90), *Klebsiella pneumoniae* (9%; 8/90), *Moellerella*

winsconsensis (8%; 7/90), *Atlantibacter hermannii* (4%; 4/90), *Salmonella enterica* (2%; 2/90), *Klebsiella variicola* (2%; 2/90), mentre le restanti specie erano rappresentate da un unico isolato ciascuna (*Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Kosakonia cowanii*, *Phytobacter diazotrophicus*, *Raoultella ornithinolytica*). Anche in altri studi (Vincenti *et al.*, 2018), il genere maggiormente isolato era *Enterobacter* spp.. Gli *Enterobacter* spp. colistina-resistenti, in base ad un recente studio, sono in aumento dal 2011-2017 con incidenza del 4,4-20%, con percentuali più alte di quelle osservate nei generi *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (Mushtaq *et al.*, 2020).

Il genere *Enterobacter* spp. e la specie *Klebsiella pneumoniae* sono annoverati tra gli organismi indicati con l'acronimo ESKAPE ovvero le sei specie batteriche (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp.) verso le quali è stata rivolta in modo particolare l'attenzione a causa della loro capacità di sfuggire all'azione dei più importanti antibiotici (Rice, 2008).

Klebsiella ed *Enterobacter* sono inoltre elencati nell'elenco delle minacce urgenti nel "Antimicrobial Resistant Threat List" del 2019 del CDC (Centro per il controllo e la prevenzione delle malattie).

K. pneumoniae, è quella che desta maggiore preoccupazione, è uno dei batteri Gram-negativi più comuni riscontrati dai medici di tutto il mondo. La polmonite primaria causata da questo patogeno è difficile da controllare ed il tasso di mortalità può essere pari al 50%, indipendentemente dal trattamento. È frequentemente riscontrata nei cibi pronti al consumo; nel nostro studio ne sono state riscontrate due produttrici di ESBL di cui una anche resistente

alla colistina in un campione di gelato artigianale ed una in un'insalata mista rte. Negli alimenti crudi ne sono state isolate 6 da carni e derivati.

Enterobacter è stato il genere più isolato (n=41) nel nostro studio con 20 ceppi isolati da alimenti rte di cui 13 da formaggi, 4 da gelati e 3 da preparazioni gastronomiche e 21 da alimenti crudi.

Enterobacter è un genere di batteri Gram-negativi, anaerobici facoltativi, fermentanti il lattosio, a forma di bastoncino della famiglia *Enterobacteriaceae*. Nel genere *Enterobacter* sono contate 22 specie. A causa della loro parentela genetica e fenotipica, sei di esse sono combinate nel cosiddetto *complesso Enterobacter cloacae* (*E. cloacae complex*), costituito da *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. hormaechei*, *E. kobei* ed *E. nimipressuralis* (Balows *et al.*, 1992). Di tutto il genere, solo *E. sakazakii* e il complesso *E. cloacae complex* hanno una significativa rilevanza clinica, e causano principalmente infezioni opportunistiche in pazienti immunocompromessi. Anche *E. bugandensis* è stata recentemente associata a infezione setticemica nei neonati e nei pazienti immunocompromessi (Pati *et al.*, 2018). *Enterobacter* spp. sono comunemente associati a infezioni del tratto urinario e dell'apparato respiratorio. Le specie multi-resistenti sono resistenti alla maggior parte dei β -lattamici e delle cefalosporine, il che le rende molto difficili da trattare (Davin-Regli *et al.*, 2019).

Escherichia coli è la specie di batterio più nota del genere *Escherichia*. Nel nostro studio, nel gruppo degli alimenti rte, sono stati isolati due ceppi da formaggio e da gelato confezionato. La maggior parte degli *E. coli* sono stati isolati da carne di pollo e tacchino con 12 ceppi su un totale di 21 isolati.

E. coli costituisce parte integrante del normale microbiota intestinale dell'uomo e di altri animali a sangue caldo. Nonostante la maggior parte dei ceppi di *E. coli* siano innocui, alcuni sono l'agente eziologico di malattie intestinali di diversa gravità (che possono manifestarsi con dolore addominale, vomito, diarrea con sangue) ed extra-intestinali, come ad esempio infezioni del tratto urinario, peritonite, setticemia, polmonite e meningite (Kim *et al.*, 2022).

L'infezione da *E. coli*, che può provenire da acqua o cibi contaminati, soprattutto da alimenti come frutta e verdura, che vengono spesso consumati crudi, ma anche da latte non pastorizzato e carne non cotta può risultare molto pericolosa soprattutto per i bambini piccoli e per gli anziani, che possono sviluppare una forma di insufficienza renale pericolosa per la vita chiamata sindrome emolitico uremica (Ojer-Usoz *et al.*, 2017; Germinario *et al.*, 2016).

Salmonella enterica nel nostro studio sono stati isolati due ceppi da carne di pollo e tacchino. La *Salmonella* è l'agente batterico più comunemente isolato nelle infezioni trasmesse da alimenti. La salmonellosi (infezione da *Salmonella*) rientra, in particolare, tra le tossinfezioni alimentari. Si tratta di microorganismi che trovano il proprio habitat ideale nell'intestino di rettili, uccelli e mammiferi, incluso l'uomo. I batteri del genere *Salmonella* si sviluppano bene sia a temperatura ambiente, che all'interno dell'organismo umano, ma non tollerano le alte temperature e pH acidi (valori inferiori a 5.5). L'infezione si trasmette attraverso acqua potabile o alimenti contaminati da feci di persone infette.

Citrobacter spp. è stato isolato da alimenti RTE, un *Citrobacter freundii* da una preparazione gastronomica a base di pesce ed un ceppo di *Citrobacter braakii* produttore di ESBL isolato da mozzarelle.

Citrobacter è un genere di batteri ubiquitari capace di causare infezioni nell'uomo, quando si comportano da patogeni opportunisti. Il batterio colpisce prevalentemente le vie urinarie, ma può anche essere responsabile di sepsi, meningite e danni al sistema nervoso centrale. Molte infezioni da *Citrobacter* sono acquisite per via nosocomiale; tuttavia, possono anche essere acquisiti in comunità, tramite contagio interpersonale. Le infezioni da *Citrobacter* sono pericolose soprattutto per i bambini (in particolare, neonati prematuri o che presentano peso alla nascita molto basso) e gli adulti immunodepressi, vulnerabili agli agenti infettivi (Liu *et al.*, 2018).

Moellerella wisconsensis è stata isolata da 6 diversi campioni di carne e da una preparazione gastronomica a base di pesce rte. Si tratta di un patogeno emergente, il nome è stato proposto da Hickman-Brenner *et al.* nel 1984, dopo che il microbiologo danese Vagn Møller, fino ad allora, aveva isolato 6 dei 9 ceppi conosciuti in Wisconsin, USA (Hickman-Brenner *et al.*, 1984). Sebbene sia un batterio raro nella pratica clinica quotidiana, ci sono diversi casi clinici in letteratura che descrivono il suo isolamento da campioni clinici, come feci umane, bile, sangue, aspirato bronchiale e tampone di ferita (Germanou *et al.*, 2022).

Atlantibacter hermannii resistente alla colistina è stato isolato da due campioni di formaggi, da una salsiccia stagionata rte e da una spigola cruda. Descritto per la prima volta nel 1982 (Brenner *et al.*, 1982), è stato distinto da *E. coli* per le sue caratteristiche genomiche (Pien *et al.*, 1985). *A. hermannii* causa raramente infezioni umane e si suppone che sia principalmente un co-infettore nelle infezioni polimicrobiche e non considerato veramente patogeno (Dahl *et al.*, 2002). Esistono tuttavia evidenze della patogenicità di questo batterio, che sembra essere in

grado di provocare infezioni anche in soggetti immunocompetenti e non predisposti (Tong *et al.*, 2014).

Altre specie isolate sono state 2 *Klebsiella variicola* da due alimenti RTE, un gelato ed una insalata mista di IV gamma; un *Phytobacter diazotrophicus* da gelato, *Kosakonia cowanii* e *Raoultella ornithinolytica* isolate da alimenti crudi. Questi batteri raramente causano infezioni nell'uomo.

I 90 ceppi isolati in questo studio sono stati analizzati per la sensibilità antimicrobica a 32 antibiotici, classificati in 12 classi. I livelli di resistenza più elevati sono stati osservati con gli antibiotici β -lattamici: ampicillina (91%), cefazolina (86%), ampicillina/sulbactam (73%) amoxicillina-acido clavulanico (54%), cefotaxime (54%), cefoxitina (52%), ceftriaxone (47%) e ceftazidime (38%). Risultati comparabili sono stati riportati in altri studi, in cui *Enterobacteriaceae* hanno mostrato tassi di resistenza ad ampicillina (66%), cefalotina (57% o 79,7%), amoxicillina-acido clavulanico (33% o 33,3%) e cefoxitina (31% o 36,1%) (Vincenti *et al.*, 2018; Al-Kharousi *et al.*, 2019). In questo studio, gli isolati resistenti alla colistina presentavano maggiore resistenza verso ampicillina (83%), amoxicillina/ac. clavulanico (61%), ampicillina/sulabactam (61%), cefazolina (72%) e cefoxitina (61%). In quanto la maggior parte di questi isolati (n=28) sono del genere *Enterobacter* che presenta resistenze intrinseche a questi 5 antibiotici. Gli isolati produttori di ESBL, oltre ad avere elevati livelli di resistenza verso tutti i beta-lattamici (100% per ampicillina, cefazolina, cefotaxime), avevano una resistenza compresa tra il 73% ed il 44% verso il sulfisoxazolo, la streptomina, la tetraciclina, il trimetoprim e la ciprofloxacina. Infatti, negli Enterobatteri la produzione di ESBL è spesso

associata alle resistenze ad altri antibiotici non appartenenti alla classe dei β -lattamici, quali aminoglicosidi (come amikacina, gentamicina, streptomina ecc.), fluorochinoloni (come ciprofloxacina), trimetoprim, tetracicline (come tetracycline), sulfamidici (come sulfisossazolo) e cloramfenicoli (Moawad *et al.*, 2018).

Nel nostro studio, 78 isolati su 90 (87%) hanno dimostrato resistenza multi-farmaco (MDR). E il 7,4% (74/1.000) degli alimenti esaminati erano positivi per la presenza di ceppi MDR. Ricerche precedenti hanno rilevato un'incidenza di MDR dell'1,9% nei campioni di alimenti crudi e cotti in Cina (Guo *et al.*, 2016), dello 0,6% nelle verdure fresche in Spagna (Falomir *et al.*, 2013), del 16% nella frutta e verdura fresca in Arabia (Al-Kharousi *et al.*, 2019), del 50% negli alimenti pronti al consumo delle mense comunitarie di Roma, Italia (Vincenti *et al.*, 2018). Un aspetto fondamentale in questo lavoro è stata l'analisi del genoma condotta sui 90 ceppi isolati. È stata eseguita mediante la tecnica del whole genome sequencing (wgs) che è ormai diventata la tecnica elettiva per la caratterizzazione genotipica di microrganismi MDR, perché fornisce accesso a tutto il corredo genetico di un microrganismo, con tempistiche molto più rapide rispetto alle metodologie convenzionali. Grazie a queste caratteristiche, il wgs risulta uno strumento fondamentale per il monitoraggio di focolai epidemici.

Il sequenziamento, eseguito con tecnologia Illumina, ci ha permesso di evidenziare la presenza di geni di resistenza, della virulenza e plasmidi. In particolare, l'analisi genomica ha rivelato un totale di 510 geni di resistenza antimicrobica (ARG) nei 90 isolati esaminati. Gli ARGs sono stati raggruppati in classi in base alla resistenza agli antibiotici. Le classi più frequentemente rilevate sono state quella delle pompe di efflusso 24% e quella dei β -lattamici 22%, seguite con

percentuali più basse da amminoglicosidi, sulfonamidi, tetracicline, fosfomicina, trimetoprim, chinoloni, cloramfenicoli e macrolidi.

In questo studio, sette isolati possedevano il gene di resistenza alla colistina *mcr*. Un isolato di *E. coli* trasportava il gene *mcr-1.1*, mentre sei ceppi di *Enterobacter* spp. presentavano i geni *mcr-9.1* e *mcr-10.1*. La resistenza alla colistina associata all'acquisizione dei geni *mcr*, trasportati da plasmidi, svolge un ruolo importante nella resistenza alla colistina e rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana (Barlaam *et al.*, 2019; Lay *et al.*, 2021). Bestiame, pollame e prodotti alimentari correlati sono stati identificati come serbatoi per la diffusione di geni *mcr* portati da *Enterobacteriaceae* agli esseri umani (Liu *et al.*, 2016). Secondo l'EFSA (2020), la resistenza alla colistina è significativamente più prevalente in *E. coli* MDR provenienti da pollame (2,7%) e tacchini (9,5%) rispetto a suini (0,2%) e vitelli (0,4%) (European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2023). I geni *mcr-9* e *mcr-10*, frequentemente trovati in *Enterobacter* spp. (Liao *et al.*, 2022), sono stati analogamente identificati in questo studio. In letteratura, oltre ai geni *mcr*, sono stati descritti altri meccanismi di resistenza alla colistina in *Enterobacteriaceae* quali modificazioni dei lipopolisaccaridi, pompe di efflusso, formazione della capsula e sovraespressione di proteine di membrana (Olaitan *et al.*, 2014).

In questo studio, almeno un gene di resistenza ai β -lattamici è stato rilevato in 81 su 90 (90%) isolati. Tutti i 41 ceppi di *Enterobacter* spp. possedevano beta-lattamasi di tipo AmpC (*blaACT* e *blaCMH*) e mostravano resistenza fenotipica alle cefalosporine di prima generazione e alla cefoxitina. I quattro isolati di *A. hermannii* hanno dimostrato resistenza fenotipica

all'ampicillina e presentavano il gene *blaHERA*, indicativo di resistenza all'ampicillina. I ceppi di *C. freundii* e *C. braakii* portavano il gene AmpC (*blaCMY*), solitamente associato a *C. freundii* (Li *et al.*, 2017), mostrando resistenza all'ampicillina, alle cefalosporine di prima generazione e alla cefoxitina. I due ceppi di *K. variicola* e quello di *R. ornithinolytica* possedevano rispettivamente i geni *blaLEN* e *blaORN-1* ed erano resistenti all'ampicillina. Tre ceppi, *E. coli* (ESBL075), *K. pneumoniae* (ESBL039) e *E. kobei* (ESBL121), resistenti alla colistina, possedevano geni delle β -lattamasi (*blaTEM-1*, *blaSHV-145* e *blaSHV-12*) e si sono dimostrati fenotipicamente produttori di Beta-lattamasi ad ampio spettro il ceppo di *E. coli* e di ESBL gli altri due. I 21 ceppi di *E. coli*, le 8 *K. pneumoniae*, le due *S. enterica*, due *E. hormaechei* avevano almeno un gene *blaTEM*, *bla CTX-M*, *blaSHV* che codificano per la produzione degli enzimi ESBL. Tra i geni ESBL i più frequenti sono stati i *blaCTX-M* con una percentuale del 38%. Le ESBL di tipo CTX-M mostrano una potente attività contro cefotaxime e ceftriaxone, ma generalmente non contro ceftazidime. Tuttavia, sono state identificate diverse varianti di CTX-M con un'attività verso il ceftazidime. La diffusione rapida e massiccia delle ESBL di tipo CTX-M ha modificato l'epidemiologia delle ESBL e, in alcune aree geografiche, questi enzimi sono ora le ESBL più prevalenti nei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Rossolini *et al.*, 2008). In uno studio su 925 *E. coli* produttori di ESBL isolati da diverse matrici, i geni del gruppo CTX-M sono risultati i più frequenti sia negli isolati umani che in quelli animali. In particolare, CTX-M-15 è risultato il gene più frequente nell'uomo (75,0%) e nei bovini (51,1%), CTX-M-1 era più diffuso nei suini (58,3%), mentre nel pollame è stato individuato con maggiore frequenza il gene CTX-M-15 (36,6%) (Giufre *et al.*, 2021).

Altri geni delle Beta-lattamasi erano *blaOKP* e *blaOXA-1* e *blaOXA-10* presenti in un isolato di *K. pneumoniae*, in due *Enterobacter* e in un *E. coli* tutti fenotipicamente ESBL.

I geni di resistenza alla classe degli antibiotici aminoglicosidi (*aac*, *aph*, *aad*, *ant*) sono stati rilevati in 36 isolati (40%), tra questi 30 ceppi esprimevano la resistenza fenotipica ad almeno una delle quattro molecole testate (amikacina, streptomina, tobramicina e gentamicina). Due isolati (ESBL91 e ESBL129), invece, mostravano resistenza fenotipica ad amikacina e a streptomina, ma non presentavano i geni di resistenza specifici.

I geni di resistenza al cloramfenicolo (*catA*, *clmA*) sono stati rilevati in 18 isolati (20%), tra cui 13 esprimevano la resistenza fenotipica al cloramfenicolo. Tre isolati invece, mostravano resistenza fenotipica al cloramfenicolo, ma non i geni specifici.

I geni di resistenza ai fluorochinoloni (*qnr*) sono stati identificati in 16 isolati (18%), tra cui 11 erano fenotipicamente resistenti ad almeno una delle tre molecole testate (ciprofloxacina, levofloxacina e acido nalidixico). Undici isolati, invece mostravano resistenza fenotipica ai fluorochinoloni, ma non avevano i geni specifici.

I geni di resistenza agli antibiotici della classe dei macrolidi (*mef*, *mph*, *ereA*) sono stati rilevati in 9 isolati (10%), tra cui 4 erano anche fenotipicamente resistenti alla azitromicina. Sei isolati, invece mostravano resistenza fenotipica all'azitromicina, ma non avevano i geni specifici.

I geni che conferiscono resistenza agli antibiotici della classe dei trimetoprim (*dfrA*, *floR*) erano presenti in 25 isolati (28%), tra cui 24 erano anche fenotipicamente resistenti al trimetoprim. Un isolato, invece mostravano resistenza fenotipica al trimetoprim, ma non aveva i geni specifici.

I geni di resistenza ai sulfamidici (*sul*) sono stati trovati in 32 isolati (36%) ed erano tutti anche fenotipicamente resistenti al sulfisossazolo. Invece 8 isolati mostravano resistenza fenotipica al sulfisossazolo, ma non avevano i geni specifici.

I geni di resistenza alla classe delle tetracicline (*tet*) erano presenti in 29 isolati (32%) ed erano tutti anche fenotipicamente resistenti ad almeno una delle molecole testate (tetraciclina, minociclina), nessun isolato mostrava resistenza alla tigeciclina. Cinque isolati, invece mostravano resistenza fenotipica alla tetraciclina o alla minociclina, ma non avevano i geni specifici.

I geni delle pompe di efflusso (*mdfA* e *oqxA* e *oqxB*) che conferiscono resistenze a più classi di antibiotici, erano presenti in 71 isolati (79%).

Il gene di resistenza alla fosfomicina (*fosA*) è stato trovato in 50 isolati (56%), ma non è stato correlato questo risultato con la resistenza fenotipica, poiché non è stata testata la suscettibilità all'antibiotico corrispondente. Un isolato portava il gene della resistenza alla lincomicina, ma non è stato correlato questo risultato con la resistenza fenotipica, poiché non è stata testata la suscettibilità all'antibiotico corrispondente.

Non sono stati trovati geni di resistenza antimicrobica in 7 isolati (8%), inclusi *Kosakonia cowanii* e 6 *M. wisconsensis*.

In questo studio, è stata osservata una correlazione significativa tra la presenza di geni di resistenza antimicrobica (ARGs) e la resistenza fenotipica, in particolare per β -lattamasi, sulfamidici e tetracicline. Tuttavia, i geni AMR acquisiti nei genomi batterici non conferiscono necessariamente resistenza fenotipica e viceversa (Boolchandani *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2022).

Altri meccanismi, non esaminati in questo studio, come la resistenza antimicrobica conferita da polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), possono contribuire alla resistenza fenotipica (Boolchandani *et al.*, 2019).

L'analisi genomica in questo studio ha rivelato un totale di 204 geni di virulenza (VGs) associati a diversi meccanismi di virulenza e patogenicità negli isolati. In accordo con altri studi, il gene più frequentemente rilevato (83/90; 92%) è stato *ompA*, che codifica per una proteina della membrana esterna (Scheller *et al.*, 2021). Tra gli isolati, i due isolati di *S. enterica* con 117 geni della virulenza, seguiti dal ceppo di *E. coli* resistente alla colistina (ESBL075) con 84 VGs, avevano il numero più alto di geni di virulenza, indicando un elevato potenziale di patogenicità. Gli isolati resistenti alla colistina avevano un numero di geni della virulenza tendenzialmente più basso tra 14 e 0, mentre gli *E. coli* produttori di Beta-lattamasi erano gli isolati con più geni della virulenza tra 84 e 37 VGs. Gli isolati di *Klebsiella* spp. avevano da un massimo di 21 (un solo isolato) ad un minimo di 10 VGs (in 5 isolati). I tre *Enterobacter* spp. (ESBL121; ESBL134; ESBL139) che tra gli isolati del genere *Enterobacter*, avevano il maggior numero di geni AMR, presentavano di contro solo 1 o 2 geni della virulenza.

In questo studio, sono stati identificati, mediante PlasmidFinder, un totale di 52 repliconi, o parti di repliconi, negli isolati analizzati. Quindici ceppi non contenevano plasmidi identificabili. Tra i 90 isolati, 67 ceppi ospitavano plasmidi della famiglia Inc, capaci di trasportare diversi geni di resistenza antimicrobica (AMR), inclusi quelli associati agli enzimi ESBL e geni *mcr* (Carattoli *et al.*, 2017). In particolare, in quattro dei sette isolati contenenti il gene *mcr*, sono state trovate parti attribuibili ai plasmidi IncHI2, noti per il loro ruolo nella

diffusione globale del gene *mcr* nei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Rozwandowicz *et al.*, 2018). I geni AMR trasportati da plasmidi, ovvero elementi mobili, sono potenzialmente trasferibili da batterio a batterio, anche tra specie diverse, e quindi potenzialmente più diffusibili. La loro presenza in alimenti ready-to-eat quali insalata mista, mozzarella e salsiccia stagionata, suscita preoccupazione in quanto possono arrivare nell'organismo umano ed essere trasferiti a batteri sia commensali sia patogeni, anche di altri generi e specie presenti nel tratto gastrointestinale.

Pertanto, i risultati di questo studio hanno evidenziato la presenza di *Enterobacteriaceae* resistenti agli antimicrobici in diverse fonti alimentari, inclusi alimenti pronti al consumo, che presentano resistenza non solo agli antibiotici di uso comune ma anche a molecole annoverate nella lista dei Critically Important Antimicrobials come la colistina o le cefalosporine, antibiotici di ultima risorsa utili per il trattamento delle infezioni multiresistenti. L'analisi genomica ha rivelato la presenza di geni di resistenza antimicrobica (AMR) che potrebbero essere potenzialmente trasferiti da batteri commensali a batteri patogeni, rappresentando una preoccupazione per la salute pubblica.

L'applicazione di test molecolari per il rilevamento rapido e accurato dei determinanti di resistenza è cruciale per ridurre e controllare le infezioni da batteri MDR (multidrug-resistant) e per comprendere l'epidemiologia e le dinamiche di diffusione dei geni AMR. La combinazione di analisi genomica e test fenotipici fornisce una comprensione più completa dei meccanismi di resistenza batterica, essenziale per sviluppare strategie di trattamento efficaci.

Per contrastare la diffusione dell'antibiotico-resistenza appare chiaro come sia assolutamente necessario destinare maggiori risorse in questo campo per poter formulare piani di prevenzione e di contrasto più efficaci.

La tabella supplementare S2, allegata alla presente tesi, riassume i risultati aggregati dei metodi utilizzati.

10. CONCLUSIONI

Gli antibiotici sono essenziali per la salute umana e animale, poiché senza di essi molte infezioni non sarebbero curabili e potrebbero causare gravi complicazioni, con un aumento significativo del tasso di mortalità. L'importanza degli antibiotici non è dunque in discussione, ma è fondamentale evitarne l'uso improprio o eccessivo, poiché tali comportamenti favoriscono l'insorgenza dell'antibiotico-resistenza.

L'antibiotico-resistenza rappresenta una sfida rilevante sia per la salute umana che per quella animale. Contrastare lo sviluppo di microrganismi resistenti è complesso e richiede un'attenzione mirata su più livelli, dalla gestione degli allevamenti e dell'ambiente zootecnico fino ai protocolli di somministrazione dei farmaci negli esseri umani.

La strategia più efficace per affrontare questo fenomeno in crescita è l'approccio "*One Health*", che promuove una visione integrata della salute umana, animale e ambientale. Un elemento chiave di questa strategia è la regolamentazione dell'uso degli antibiotici negli allevamenti, limitandone l'impiego e garantendo pratiche corrette. Allo stesso tempo, nell'uomo, è necessario rispettare rigorosamente le indicazioni sulla somministrazione e l'uso dei farmaci, evitando abusi e assunzioni inappropriate. Nei contesti ospedalieri e nelle strutture di lungo degenza, è cruciale adottare misure igieniche stringenti per limitare la diffusione di infezioni resistenti.

Un ulteriore aspetto determinante è la ricerca di nuove molecole antibiotiche, che però appare limitata, soprattutto in Italia. Una strategia alternativa consiste nell'investire in nuovi sistemi diagnostici più rapidi e sensibili e nell'implementazione di "terapie alternative", come l'uso di peptidi antimicrobici, probiotici e interventi mirati sul microbiota intestinale. Questi approcci

possono migliorare significativamente le possibilità di guarigione, rendendo le terapie più specifiche per il microrganismo responsabile dell'infezione.

Data la natura globale dell'antibiotico-resistenza ogni Paese deve impegnarsi a promuovere una cultura della prevenzione come strumento principale di contrasto alla resistenza antimicrobica. Ciò include l'adozione di stili di vita sani, investimenti in procedure sanitarie adeguate e una corretta informazione rivolta sia al personale sanitario sia ai cittadini.

La lotta contro i batteri resistenti richiede un impegno congiunto e una "co-responsabilità" tra diverse figure professionali: allevatori, veterinari, medici, ricercatori, farmacisti, biologi, infermieri e personale ospedaliero. Un ruolo centrale spetta anche ai pazienti, che devono seguire correttamente le terapie prescritte per evitare complicazioni e ridurre il rischio di infezioni secondarie. Nei casi di ricovero ospedaliero, una dimissione precoce e una gestione domiciliare della terapia possono contribuire a ridurre l'esposizione a patogeni resistenti.

Prevenire le malattie resta l'obiettivo primario per la salute umana e animale. Tuttavia, in caso di necessità di trattamento antibiotico, è essenziale rispettare quattro principi fondamentali: scegliere il farmaco adeguato, utilizzarlo nel dosaggio corretto, per la durata appropriata e con il giusto intervallo di somministrazione. Infine, anche i cittadini devono assumersi la responsabilità di informarsi, adottare comportamenti consapevoli e contribuire attivamente alla lotta contro l'antibiotico-resistenza. Sebbene l'eliminazione totale dei batteri sia impossibile, con un uso corretto degli antibiotici e adeguate strategie di prevenzione, è possibile limitarne significativamente i danni.

7. BIBLIOGRAFIA

- AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P. & Anjum, M.F. (2018). *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**, 2904–2904.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. & S Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**, 5575–5599.
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K. & Demnerová, K. (2014). *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Molecular Biology Reports*, **41**, 5005–5018.
- Al-Kharousi, Z.S., Guizani, N., Al-Sadi, A.M. & Al-Bulushi, I.M. (2019). Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC β -Lactamases. *Journal of Food Protection*, **82**, 1857–1863.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. & Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, **19**, 455–477.
- Barlaam, A., Parisi, A., Spinelli, E., Caruso, M., Taranto, P.D. & Normanno, G. (2019). Global Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Food Chains and Associated Food Safety Implications: A Review. *Journal of Food Protection*, **82**, 1440–1448.
- Bennett, J.W. & Chung, K.-T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. In: *Advances in Applied Microbiology*. Pp. 163–184. Elsevier.
- Bevan, E.R., Jones, A.M. & Hawkey, P.M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**, 2145–2155.
- Bianco, A., Capozzi, L., Monno, M.R., Del Sambro, L., Manzulli, V., Pesole, G., Loconsole, D. & Parisi, A. (2021). Characterization of *Bacillus cereus* Group Isolates From Human Bacteremia by Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 599524.
- Biswas, S., Brunel, J.-M., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M. & Rolain, J.-M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **10**, 917–934.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. & Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, **13**, 42–51.
- Bonomo, R.A. (2017). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **7**, a025239.

- Boolchandani, M., D'Souza, A.W. & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I. & Malorny, B. (2017). 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**, 3317–3324.
- Bourdichon, F., Betts, R., Dufour, C., Fanning, S., Farber, J., McClure, P., Stavropoulou, D.A., Wemmenhove, E., Zwietering, M.H. & Winkler, A. (2021). Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, **356**, 109351.
- Brenner, D.J., Davis, B.R., Steigerwalt, A.G., Riddle, C.F., McWhorter, A.C., Allen, S.D., Farmer, J.J., Saitoh, Y. & Fanning, G.R. (1982). Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, **15**, 703–713.
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G. & Magistrali, C.F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, **22**.
- Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L.O. & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, **10**, e00853-19.
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I.N., Dobрева, E.G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G.L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K.G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M.A., De Greeff, S.C., Monen, J.C., Koek, M.B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P.J., Fernandes, P.A., Manageiro, V., Popescu, G.A., Serban, R.I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J.S., Johnson, A. & Hopkins, S. (2019). 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. *The Lancet Infectious Diseases*, **19**, 56–66.
- Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C.S. & Zhang, D. (2021). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 750662.
- Chapman, B. & Gunter, C. (2018). Local Food Systems Food Safety Concerns. In: *Preharvest Food Safety* (edited by S. Thakur & K.E. Kniel). Pp. 249–260. Washington, DC, USA: ASM Press.

- Cho, H., Uehara, T. & Bernhardt, T.G. (2014). Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell*, **159**, 1300–1311.
- CLSI. (2010). Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved twentieth informational supplement M 100-S20.
- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A. & Goodridge, L.D. (2017). Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1108.
- Conte, V., Monaco, M., Giani, T., D’Ancona, F., Moro, M.L., Arena, F., D’Andrea, M.M., Rossolini, G.M. & Pantosti, A. (2016). Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**, 3386–3391.
- Dahl, K.M., Barry, J. & DeBiasi, R.L. (2002). *Escherichia hermannii* Infection of a Cephalohematoma: Case Report, Review of the Literature, and Description of a Novel Invasive Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, **35**, e96–e98.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P. & Pagès, J.-M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **32**, e00002-19.
- Debarbieux, L., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., De Vos, D., Merabishvili, M., Huys, I., Patey, O., Schoonjans, D., Vaneechoutte, M., Zizi, M. & Rohde, C. (2016). A bacteriophage journey at the European Medicines Agency. *FEMS Microbiology Letters*, **363**, fnv225.
- Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C.M., Zhou, K., Friedrich, A.W. & Rossen, J.W.A. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*, **243**, 16–24.
- Duijn, P.J. van, Dautzenberg, M.J.D. & Oostdijk, E.A.N. (2011). Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs: *Current Opinion in Critical Care*, **17**, 658–665.
- Eckburg, P.B., Lister, T., Walpole, S., Keutzer, T., Utley, L., Tomayko, J., Kopp, E., Farinola, N. & Coleman, S. (2019). Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Drug Interaction Potential of SPR741, an Intravenous Potentiator, after Single and Multiple Ascending Doses and When Combined with β -Lactam Antibiotics in Healthy Subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**, e00892-19.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals :2011 2012*. LU: Publications Office.
- European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal*, **21**.

- Eyre, D.W., Tracey, L., Elliott, B., Slimings, C., Huntington, P.G., Stuart, R.L., Korman, T.M., Kotsiou, G., McCann, R., Griffiths, D., Fawley, W.N., Armstrong, P., Dingle, K.E., Walker, A.S., Peto, T.E., Crook, D.W., Wilcox, M.H. & Riley, T.V. (2015). Emergence and spread of predominantly community-onset *Clostridium difficile* PCR ribotype 244 infection in Australia, 2010 to 2012. *Eurosurveillance*, **20**.
- Falomir, M.P., Rico, H. & Gozalbo, D. (2013). *Enterobacter* and *Klebsiella* Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, **10**, 1002–1007.
- Ferdous, M., Friedrich, A.W., Grundmann, H., De Boer, R.F., Croughs, P.D., Islam, M.A., Kluytmans-van Den Bergh, M.F.Q., Kooistra-Smid, A.M.D. & Rossen, J.W.A. (2016). Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**, 642.e1-642.e9.
- Florez-Cuadrado, D., Moreno, M.A., Ugarte-Ruiz, M. & Domínguez, L. (2018). Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Advances in Food and Nutrition Research*, **86**, 115–136.
- Germanou, D., Spernovasilis, N., Papadopoulos, A., Christodoulou, S. & Agouridis, A.P. (2022). Infections Caused by *Moellerella wisconsensis*: A Case Report and a Systematic Review of the Literature. *Microorganisms*, **10**, 892.
- Germinario C, Caprioli A, Giordano M, Chironna M, Gallone MS, Tafuri S, Minelli F, Maugliani A, Michelacci V, Santangelo L, Mongelli O, Montagna C, Scavia G, on behalf of all participants of the Outbreak investigation team. Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26:H11 in southern Italy, summer 2013. *Euro Surveill*. 2016;21(38):pii=30343. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30343>
- Giani, T., Antonelli, A., Caltagirone, M., Mauri, C., Nicchi, J., Arena, F., Nucleo, E., Bracco, S., Pantosti, A., The AMCLI-CoSA survey participants, Luzzaro, F., Pagani, L. & Rossolini, G.M. (2017). Evolving beta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Eurosurveillance*, **22**.
- Giguère, S., Prescott, J.F. & Dowling, P.M. (Eds.). (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Giufrè, M., Mazzolini, E., Cerquetti, M., Brusaferrò, S., Accogli, M., Agnoletti, F., Agodi, A., Alborali, G.L., Arghittu, M., Auxilia, F., Barchitta, M., Bosco, N., Camporese, A., Carfora, V., Collini, L., D'Agaro, P., De Rosa, R., Formenti, N., Franco, A., Koncan, R., Lanzafame, P., Mazzariol, A., Moschioni, C., Pane, S., Putignani, L. & Thoma, C. (2021). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in humans and from food-producing animals in Italy: a 'One Health' study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **58**, 106433.

Grundmann, H., Glasner, C., Albiger, B., Aanensen, D.M., Tomlinson, C.T., Andrasević, A.T., Cantón, R., Carmeli, Y., Friedrich, A.W., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Nordmann, P., Poirel, L., Rossolini, G.M., Seifert, H., Vatopoulos, A., Walsh, T., Woodford, N., Monnet, D.L., Koraqi, A., Lacey, D., Apfalter, P., Hartl, R., Glupczynski, Y., Huang, T.-D., Strateva, T., Marteva-Proevska, Y., Andrasevic, A.T., Butic, I., Pieridou-Bagatzouni, D., Maikanti-Charalampous, P., Hrabak, J., Zemlickova, H., Hammerum, A., Jakobsen, L., Ivanova, M., Pavelkovich, A., Jalava, J., Österblad, M., Dortet, L., Vaux, S., Kaase, M., Gatermann, S.G., Vatopoulos, A., Tryfinopoulou, K., Tóth, Á., Jánvári, L., Boo, T.W., McGrath, E., Carmeli, Y., Adler, A., Pantosti, A., Monaco, M., Raka, L., Kurti, A., Balode, A., Saule, M., Miciuleviciene, J., Mierauskaite, A., Perrin-Weniger, M., Reichert, P., Nestorova, N., Debattista, S., Mijovic, G., Lopacic, M., Samuelsen, Ø., Haldorsen, B., Zabicka, D., Literacka, E., Caniça, M., Manageiro, V., Kaftandzieva, A., Trajkovska-Dokic, E., Damian, M., Lixandru, B., Jelesic, Z., Trudic, A., Niks, M., Schreterova, E., Pirs, M., Cerar, T., Oteo, J., Aracil, B., Giske, C., Sjöström, K., Gür, D., Cakar, A., Woodford, N., Hopkins, K., Wiuff, C. & Brown, D.J. (2017). Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *The Lancet Infectious Diseases*, **17**, 153–163.

Guo, Y., Zhou, H., Qin, L., Pang, Z., Qin, T., Ren, H., Pan, Z. & Zhou, J. (2016). Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *PLOS ONE*, **11**, e0153561.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, **29**, 1072–1075.

Hickman-Brenner, F.W., Huntley-Carter, G.P., Saitoh, Y., Steigerwalt, A.G., Farmer, J.J. & Brenner, D.J. (1984). *Moellerella wisconsensis*, a new genus and species of Enterobacteriaceae found in human stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **19**, 460–463.

Hu, J. & Torres, A.G. (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **21**, 729–734.

Janda, J.M. & Abbott, S.L. (2021). The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*, **34**, e00174-20.

Joensen, K.G., Tetzschner, A.M.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M. & Scheutz, F. (2015). Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**, 2410–2426.

Karaiskos, I., Souli, M., Galani, I. & Giamarellou, H. (2017). Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **13**, 59–71.

Kim, B.; Kim, J.-H.; Lee, Y. Virulence Factors Associated with *Escherichia coli* Bacteremia and Urinary Tract Infection. *Ann Lab Med* 2022, **42**, 203–212, doi:10.3343/alm.2022.42.2.203

- Kurland, C.G., Canback, B. & Berg, O.G. (2003). Horizontal gene transfer: A critical view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 9658–9662.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D. & Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**, 1057–1098.
- McEwen, S.A. & Collignon, P.J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (edited by S. Schwarz, L.M. Cavaco & J. Shen). Pp. 521–547. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A.D., Drake, R.R., Eigner, U., Fahr, A.M., He, Y., Ilina, E.N., Kostrzewa, M., Maier, T., Mancinelli, L., Moussaoui, W., Prévost, G., Putignani, L., Seachord, C.L., Tang, Y.W. & Harmsen, D. (2009). High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 3732–3734.
- Lay, K.K., Jamsripong, S., Sunn, K.P., Angkititrakul, S., Prathan, R., Srisanga, S. & Chuanchuen, R. (2021). Colistin Resistance and ESBL Production in Salmonella and Escherichia coli from Pigs and Pork in the Thailand, Cambodia, Lao PDR, and Myanmar Border Area. *Antibiotics*, **10**, 657.
- Lencina, F.A., Bertona, M., Stegmayer, M.A., Olivero, C.R., Frizzo, L.S., Zimmermann, J.A., Signorini, M.L., Soto, L.P. & Zbrun, M.V. (2024). Prevalence of colistin-resistant Escherichia coli in foods and food-producing animals through the food chain: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, **10**, e26579.
- Li, X.-P., Fang, L.-X., Jiang, P., Pan, D., Xia, J., Liao, X.-P., Liu, Y.-H. & Sun, J. (2017). Emergence of the colistin resistance gene mcr-1 in Citrobacter freundii. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**, 786–787.
- Liao, W., Cui, Y., Quan, J., Zhao, D., Han, X., Shi, Q., Wang, Q., Jiang, Y., Du, X., Li, X. & Yu, Y. (2022). High prevalence of colistin resistance and mcr-9/10 genes in Enterobacter spp. in a tertiary hospital over a decade. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **59**, 106573.
- Littmann, J. & Viens, A.M. (2015). The Ethical Significance of Antimicrobial Resistance. *Public Health Ethics*, phv025.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H. & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, **16**, 161–168.

Liu L, Chen D, Liu L, Lan R, Hao S, Jin W, Sun H, Wang Y, Liang Y and Xu J (2018) Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:233. doi: 10.3389/fcimb.2018.00233

Long, Y., Zhang, Y., Gong, Y., Sun, R., Su, L., Lin, X., Shen, A., Zhou, J., Caiji, Z., Wang, X., Li, D., Wu, H. & Tan, H. (2016). Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Archives of Medical Research*, **47**, 365–371.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**, 268–281.

Mendelson, M., Brink, A., Gouws, J., Mbelle, N., Naidoo, V., Pople, T., Schellack, N., Van Vuuren, M., Rees, H., Banoo, S., Bokaba, K., Collins, M., Faure, K., Herbst, M., Hoek, B., Lancaster, R., Lotter, J., Modisane, M., Mohlala, M., Mokantla, E., Molatuli, A., Molefe, M., Molewa, G., Mompoti, K., Moshiga, L., Munbodh, S., Nkambule, P., Patterson, C., Reddy, D., Sigobondhla, A., Suliman, S. & Swan, G. (2018). The One Health stewardship of colistin as an antibiotic of last resort for human health in South Africa. *The Lancet Infectious Diseases*, **18**, e288–e294.

Moawad, A.A., Hotzel, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., Tomaso, H., Hafez, H.M., Roesler, U. & El-Adawy, H. (2018). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae from healthy broilers in Egypt: emergence of colistin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, **10**, 39.

Mondal, A.H., Khare, K., Saxena, P., Debnath, P., Mukhopadhyay, K. & Yadav, D. (2024). A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. *Microorganisms*, **12**, 772.

Muloi, D., Ward, M.J., Pedersen, A.B., Fèvre, E.M., Woolhouse, M.E.J. & Bunnik, B.A.D. van. (2018a). Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, **15**, 467–474.

Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F.-X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J.A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalho, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Clotaire Donatien, R., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Duong Bich, T., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S.,

Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A.W.J., Khorana, M., Khusuwan, S., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L.A., Mussi-Pinhata, M.M., Naidu, R.N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Ochoa, T.J., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G.D., Paredes, J.L., Peleg, A.Y., Perrone, C., Phe, T., Phommasone, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rosenthal, V.D., Rudd, K.E., Russell, N., Sader, H.S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J.A.G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Simpson, A.J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Van Doorn, H.R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Young Sharma, T.E.M.W., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C. & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, **399**, 629–655.

Mushtaq, S., Reynolds, R., Gilmore, M.C., Esho, O., Adkin, R., García-Romero, I., Chaudhry, A., Horner, C., Bartholomew, T.L., Valvano, M.A., Dry, M., Murray, J., Pichon, B. & Livermore, D.M. (2020). Inherent colistin resistance in genogroups of the *Enterobacter cloacae* complex: epidemiological, genetic and biochemical analysis from the BSAC Resistance Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **75**, 2452–2461.

Nathwani, D., Eckmann, C., Lawson, W., Stephens, J.M., Macahilig, C., Solem, C.T., Simoneau, D., Chambers, R., Li, J.Z. & Haider, S. (2014). Pan-European early switch/early discharge opportunities exist for hospitalized patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* complicated skin and soft tissue infections. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**, 993–1000.

Nordmann, P., Dortet, L. & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, **18**, 263–272.

Ojer-Usoz, E., González, D. & Vitas, A. (2017). Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental, Human and Food Samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14**, 676.

Olaitan, A.O., Morand, S. & Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, **5**.

Ortwine, J.K., Sutton, J.D., Kaye, K.S. & Pogue, J.M. (2015). Strategies for the safe use of colistin. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **13**, 1237–1247.

Orwa, J.A., Govaerts, C., Busson, R., Roets, E., Van Schepdael, A. & Hoogmartens, J. (2001). Isolation and structural characterization of polymyxin B components. *Journal of Chromatography A*, **912**, 369–373.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A. & Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 4943–4960.

- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N. & Jensen, S.O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **31**, e00088-17.
- Pati, N.B., Doijad, S.P., Schultze, T., Mannala, G.K., Yao, Y., Jaiswal, S., Ryan, D., Suar, M., Gwozdziński, K., Bunk, B., Mraheil, M.A., Marahiel, M.A., Hegemann, J.D., Spröer, C., Goesmann, A., Falgenhauer, L., Hain, T., Imirzalioglu, C., Mshana, S.E., Overmann, J. & Chakraborty, T. (2018). *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Scientific Reports*, **8**, 5392.
- Pecora, N.D., Li, N., Allard, M., Li, C., Albano, E., Delaney, M., Dubois, A., Onderdonk, A.B. & Bry, L. (2015). Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. *mBio*, **6**, e01030-15.
- Pérez-Rodríguez, F. & Mercanoglu Taban, B. (2019). A State-of-Art Review on Multi-Drug Resistant Pathogens in Foods of Animal Origin: Risk Factors and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 2091.
- Pien, F.D., Shrum, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Thornsberry, C. & Farmer, J.J. (1985). Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hermannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**, 283–285.
- Poirel, L. & Nordmann, P. (2016). Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**, 2326–2327.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, **109**, 309–318.
- Pyörälä, S., Baptiste, K.E., Catry, B., Van Duijkeren, E., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C.M.F., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J. & Törneke, K. (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal*, **200**, 230–239.
- Quainoo, S., Coolen, J.P.M., Van Hijum, S.A.F.T., Huynen, M.A., Melchers, W.J.G., Van Schaik, W. & Wertheim, H.F.L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, **30**, 1015–1063.
- Randall, L.P., Lodge, M.P., Elviss, N.C., Lemma, F.L., Hopkins, K.L., Teale, C.J. & Woodford, N. (2017). Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, **241**, 283–290.
- Rice, L.B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, **197**, 1079–1081.
- Robinson, T.P., Bu, D.P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E.M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S.I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T.P. & Woolhouse, M.E.J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue.

Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, **110**, 377–380.

Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 33–41.

Rossolini, G.M. & Docquier, J.-D. (2006). New β -Lactamases: A Paradigm for the Rapid Response of Bacterial Evolution in the Clinical Setting. *Future Microbiology*, **1**, 295–308.

Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J. & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**, 1121–1137.

Sabat, A.J., Hermelijn, S.M., Akkerboom, V., Juliana, A., Degener, J.E., Grundmann, H. & Friedrich, A.W. (2017). Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Scientific Reports*, **7**, 41050.

Santajit, S. & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, **2016**, 1–8.

Scheller, D., Twittenhoff, C., Becker, F., Holler, M. & Narberhaus, F. (2021). OmpA, a Common Virulence Factor, Is Under RNA Thermometer Control in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 687260.

Schwarz, S. & Johnson, A.P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat: Table 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**, 2066–2070.

Spratt, B.G. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **72**, 2999–3003.

Steenbergen, J.N., Alder, J., Thorne, G.M. & Tally, F.P. (2005). Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**, 283–288.

Sun, J., Zhang, H., Liu, Y.-H. & Feng, Y. (2018). Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in Microbiology*, **26**, 794–808.

Tang, B., Chang, J., Chen, Y., Lin, J., Xiao, X., Xia, X., Lin, J., Yang, H. & Zhao, G. (2022). *Escherichia fergusonii*, an Underrated Repository for Antimicrobial Resistance in Food Animals. *Microbiology Spectrum*, **10**, e01617-21.

Tang, S.S., Apisarnthanarak, A. & Hsu, L.Y. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **78**, 3–13.

Thaden, J.T., Fowler, V.G., Sexton, D.J. & Anderson, D.J. (2016). Increasing Incidence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Community Hospitals throughout the Southeastern United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **37**, 49–54.

- Tong, Y.Q., Xin, B. & Sun, S.Q. (2014). Pyelonephritis Caused Solely by *Escherichia hermannii*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **7**.
- Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y. & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, **431**, 3472–3500.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A. & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 5649–5654.
- Vincenti, S., Raponi, M., Sezzatini, R., Giubbini, G. & Laurenti, P. (2018). Enterobacteriaceae Antibiotic Resistance in Ready-to-Eat Foods Collected from Hospital and Community Canteens: Analysis of Prevalence. *Journal of Food Protection*, **81**, 424–429.
- Volta, P., Riccardi, N., Lauceri, R. & Tonolla, M. (2012). Discrimination of freshwater fish species by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): a pilot study. *Journal of Limnology*, **71**, 17.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M. & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections*, **9**, 508–516.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z. & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, **7**, 1–9.
- World Health Organization. (2015). *World report on ageing and health*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2001) WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H. & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, **21**.
- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y. & Wang, H.-N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**, 1791–1795.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J. & Wang, Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, **8**, e00543-17.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. & Vidaver, A.K. (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2198–2208.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la prof.ssa Maria Tempesta e il dott. Antonio Parisi che mi hanno dato la possibilità di affrontare il percorso del dottorato di ricerca.

Ringrazio le colleghe del laboratorio di Biotecnologie della sezione di Putignano dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata per il loro prezioso contributo relativo alle analisi genetiche.

Un sentito grazie alla mia valida e insostituibile collega, la dott.ssa Laura Maria Difato per il suo enorme contributo nella esecuzione delle analisi batteriologiche.

