



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Coordinatore del Corso: Prof.ssa Margherita Maioli

CURRICULUM IN NEUROSCIENZE

XXXV ciclo

**Il fenomeno dell'antibiotico resistenza nelle patologie ad eziologia
infettiva. La gestione del paziente critico**

Tutor:

Prof. Andrea Piana

Prof.ssa Franca Deriu

Dottoranda:

Dott.ssa Arcadia Del Rio

A.A. 2021/2022



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del Corso di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2021/2022 – XXXV ciclo, con il sostegno di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2014-2020 Asse III - Istruzione e Formazione - Obiettivo Tematico 10 “Investire nell’istruzione, nella formazione e nella formazione professionale per le competenze e l’apprendimento permanente”.

Indice

Abstract	1
1. Introduzione	
1.1 Consumo dei farmaci antimicrobici.....	3
1.2 Entità del fenomeno AMR.....	4
1.3 “One Health”.....	5
1.4 Stewardship antimicrobica.....	6
1.5 Infezioni Correlate all’Assistenza (ICA).....	8
1.6 Microrganismi ESKAPE.....	10
1.6.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
1.6.1.1 Colonizzazione e infezione da <i>K. pneumoniae</i>	15
1.6.1.2 Fattori di rischio.....	17
1.7 Meccanismi responsabili di antibiotico resistenza.....	18
1.7.1 Inattivazione o alterazione del farmaco antimicrobico.....	18
1.7.1.1 Produzione di carbapenemasi in <i>K. pneumoniae</i>	21
1.7.2 Mutazioni del bersaglio nella cellula batterica.....	25
1.7.3 Riduzione della penetrazione e dell’accumulo di antibiotico nella cellula batterica.....	26
1.7.4 Formazione di biofilm.....	27
1.8 Nuovi approcci terapeutici: β -lattamici ed inibitori delle β -lattamasi di nuova generazione.....	28
1.8.1 Ceftazidime/avibactam.....	28
1.8.2 Meropenem/vaborbactam.....	29
1.8.3 Imipenem/relebactam.....	29
1.9 <i>Whole Genome Sequencing</i>	30
2. Scopo dello studio	33
3. Materiali e Metodi	
3.1 Caratterizzazione dei ceppi co-produttori di KPC e OXA-48.....	35
3.1.1 Protocollo operativo screening CPE/CRE.....	36
3.1.2 Semina su terreno cromogeno.....	37
3.1.3 Identificazione biochimica delle colonie.....	37
3.1.4 Test di sensibilità agli antibiotici.....	38

3.1.5	RAPIDEC® CARBA NP.....	38
3.1.6	Estrazione del DNA batterico.....	39
3.1.7	Real-Time PCR.....	40
3.1.7.1	Allestimento Real-Time PCR.....	41
3.2	Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Multi Locus Sequence Type (MLST)..	42
3.3	Comparazione del profilo genotipico e fenotipico degli isolati di <i>K. pneumoniae</i> produttori di carbapenemasi.....	45
3.3.1	ETest.....	46
3.3.2	Calcolo dell' <i>Antimicrobial Resistance Index</i>	46
3.4	Sequenziamento dei ceppi tramite <i>Whole Genome Sequencing</i>	46
3.4.1	Analisi bioinformatica.....	47
3.5	Analisi statistica.....	48
4.	Risultati	
4.1	Evoluzione del quadro epidemiologico.....	49
4.2	Individuazione dei fattori di rischio.....	50
4.3	Comparazione del profilo genotipico e fenotipico degli isolati di <i>K. pneumoniae</i> produttori di carbapenemasi.....	57
4.4	Analisi del genoma batterico mediante <i>Whole Genome Sequencing</i>	61
5.	Discussione	
5.1	Evoluzione del quadro epidemiologico.....	65
5.2	Individuazione dei fattori di rischio.....	67
5.3	Comparazione del profilo genotipico e fenotipico degli isolati di <i>K. pneumoniae</i> produttori di carbapenemasi.....	68
5.4	Analisi del genoma batterico mediante <i>Whole Genome Sequencing</i>	72
6.	Conclusioni	74
7.	Bibliografia	75
8.	Stage all'estero	97
	Ringraziamenti	99

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the most relevant threats to global public health, with negative consequences in morbidity and mortality of infections caused by AMR bacteria.

Understanding the mechanisms of AMR is key for the adoption of preventive strategies and the management of patients.

This study describes the rapid nosocomial spread of *K. pneumoniae* ST512 (endemic in Italy), characterized by the co-production of class A and D carbapenemases. Clinical records analysis revealed that Intensive Care Unit admission is a risk factor for the development of Hospital Acquired Infections (HAIs).

After novel antibiotic therapies (ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam) became available, concerns about the emergence of resistant strains were expressed, thus it is crucial to identify possible resistance patterns among strains.

The comparison between phenotypic and genotypic profile of *K. pneumoniae* strains cause of HAIs gave useful information to guide therapeutic choices. Although preliminary, the data highlighted differences ($p\text{-value}<0.0001$) of the phenotypic profiles when considering the expression of different carbapenemases. This is consistent with Antimicrobial Resistance Index (ARI) values calculated for the strains included in the study, demonstrating the effectiveness of ARI for the comparison of strains based on AMR profile.

Whole Genome Sequencing (WGS) analysis showed the presence of more than 20 AMR genes, including carbapenemase encoding genes *blaKPC-3*, *blaKPC-31* and *blaOXA-181*. Plasmid location allows their spread, contributing to selection and diffusion of AMR bacteria, as seen with phenotypic analysis.

WGS implementation could provide an important tool to contrast AMR and provide tailored therapies in case of HAIs. Moreover, the adoption of rapid antimicrobial susceptibility test, based on the genotypic profile of strains can be useful to guide therapeutic choices, mainly for the management of critically ill patients.

1. Introduzione

La resistenza ai farmaci antimicrobici (AMR) è considerata un rilevante problema di sanità pubblica, ed è stata inserita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) fra i dieci pericoli di salute pubblica che l'umanità sta affrontando nel XXI secolo che richiedono azioni urgenti di contrasto [1]. L'AMR riduce drasticamente le opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento delle infezioni che in passato risultavano essere curabili con gli antibiotici in uso; inoltre, col passare degli anni, il quadro si è ulteriormente aggravato a causa della carenza di investimenti e risorse per lo sviluppo di nuovi antibiotici. Ciò determina pesanti conseguenze per il sistema sanitario, sia in termini di aumento della mortalità che della spesa sanitaria, legata all'aumento dei giorni di degenza, di procedure diagnostiche e all'impiego di ulteriori antibiotici [2].

Il fenomeno dell'AMR si verifica quando un ceppo batterico sviluppa meccanismi di adattamento che lo rendono capace di sopravvivere e proliferare in presenza di una concentrazione di un farmaco antibiotico che generalmente è sufficiente ad inibirne la crescita o a ucciderlo [3]. Tra le principali cause che determinano l'insorgenza di AMR vi è la pressione selettiva, dovuta all'uso scorretto ed eccessivo dei farmaci antimicrobici, sia a livello umano che animale.

L'introduzione dei farmaci antimicrobici nella pratica clinica ha segnato un punto di svolta nella storia recente, considerato il loro indiscutibile contributo nel miglioramento dello stato di salute della popolazione. A questo proposito, appare esemplificativo il dato in merito alle principali cause di morte a livello mondiale, nel corso del XX secolo: nel 1915, le malattie infettive erano la principale causa di morte, mentre, ad oggi, tale ruolo è rivestito dalle patologie cronico-degenerative, quali malattie cardiovascolari, e cancro e, più recentemente, dal COVID-19 [4; 5]. Il calo della mortalità per malattie infettive nel corso del tempo è certamente da attribuirsi all'avvento degli antibiotici, all'introduzione della vaccinoprofilassi e al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie in diverse regioni a livello globale.

1.1 Consumo dei farmaci antimicrobici

Considerata l'importanza che rivestono i farmaci antimicrobici e le conseguenze che possono derivare da un loro uso scorretto e incontrollato, è basilare monitorarne l'utilizzo. Fu lo stesso Fleming, scopritore della penicillina nel 1928, che durante il discorso di accettazione del Premio Nobel nel 1945 mise in guardia sulla possibilità che i batteri divenissero resistenti alla stessa molecola [6].

Il principale parametro utilizzato per descrivere il consumo di farmaci è la DDD, che indica la dose media giornaliera di mantenimento di un farmaco, utilizzato per la sua indicazione terapeutica principale nell'adulto. Il consumo in DDD viene espresso in "DDD/giorni di ricovero" oppure in "DDD/1.000 abitanti/die", ovvero come numero medio di dosi di farmaco consumato ogni giorno per 1.000 abitanti.

Per quanto riguarda il consumo di farmaci antimicrobici a livello europeo, l'Italia si attesta fra le nazioni che registrano i consumi più elevati. Infatti, le stime del sistema di sorveglianza dell'European Centre for Diseases Prevention and Control (ECDC), nel 2015 attestano che il consumo in Italia di antibatterici sistemici (ATC J01) a livello extra ospedaliero ammontava a 27,5 DDD/1000 abitanti/die, mentre 22,4 DDD/1000 abitanti/die è il consumo medio europeo. L'Italia si posiziona al quinto posto per alti livelli di consumo dopo Grecia (36,1), Romania (32,3), Francia (29,9) e Belgio (29,2). Più nello specifico, la categoria terapeutica con i valori di consumo più elevati è quella delle penicilline in associazione agli inibitori delle β -lattamasi. Per quanto riguarda l'ambito ospedaliero, nel 2015 il consumo degli antibiotici per via sistemica (ATC J01) ammontava a 2,43 DDD/1000 abitanti/die; in questo caso, la nostra nazione è preceduta da Malta (2,86), Gran Bretagna (2,55), Lituania (2,54) e Finlandia (2,50). Il consumo medio europeo è di 2,05 DDD/1000 abitanti/die [7].

Ulteriori informazioni, a livello nazionale, vengono fornite dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) che, con i dati pubblicati nel rapporto annuale sull'impiego dei medicinali, descrive la situazione sull'assistenza farmaceutica, sia in ambito ospedaliero che territoriale. Complessivamente, nel 2018 sono stati oltre 40 milioni i pazienti che hanno ricevuto almeno una prescrizione di farmaci, con una prevalenza d'uso pari al 67%, una spesa pro capite di 229 € e un consumo di 1.020 DDD/1000 abitanti/die; ciò indica che, in media, ogni cittadino italiano ha ricevuto una dose di farmaco ogni giorno dell'anno. Nello specifico, per quanto concerne il consumo dei farmaci antimicrobici, esso registra una tendenza in lieve diminuzione: si è passati da 20,3 DDD nel 2013 a 18

DDD nel 2018 [8]. Tale tendenza è stata confermata anche dai dati per l'anno 2020, in cui il consumo complessivo di antibiotici è stato di 17,7 DDD/1000 abitanti; tuttavia, i consumi di antibiotici in Italia sono superiori alla media europea [9].

La situazione desta particolare preoccupazione nei Paesi in via di sviluppo, in cui, come riportato da Morgan e collaboratori, in alcuni Stati del continente africano il tasso di consumo di antibiotici senza prescrizione arriva al 100%, mentre nelle nazioni del Sud ed Est Europa si attesta tra il 20-30% [10]. Tali dati indicano il consumo incontrollato dei farmaci antimicrobici, fattore che concorre ad alimentare il fenomeno dell'antimicrobico resistenza.

1.2 Entità del fenomeno AMR

I dati ECDC riferiscono di un aumento del fenomeno di AMR, con differenze rilevanti tra i vari Paesi membri dell'Unione Europea. In Italia, il tasso di resistenza ai farmaci antimicrobici risulta essere tra i più elevati d'Europa, specialmente per quanto riguarda *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA). Inoltre, si è assistito ad un drastico aumento della resistenza ai carbapenemi in *Klebsiella pneumoniae*: da meno dell'1% nel 2008 a oltre il 33% nel 2015, per poi attestarsi poco al di sotto del 30% negli anni successivi [11].

Un importante studio dell'ECDC riporta che nel 2015, nei Paesi dell'Unione Europea e dello Spazio Economico Europeo, si sono verificati 671.689 casi di infezioni sostenute da microrganismi antibiotico-resistenti, a cui sono attribuibili 33.110 decessi, un terzo dei quali si è verificato in Italia, sottolineando la gravità del problema nel nostro Paese [12]. In un recente studio, pubblicato nel 2022, Murray e colleghi hanno stimato la rilevanza dell'AMR a livello mondiale relativa all'anno 2019. I dati pubblicati indicano che le morti ad essa correlate siano state 4.95 milioni; le principali infezioni da batteri AMR riscontrate sono state: infezioni delle basse vie aeree, del torrente ematico ed intra-addominale, complessivamente responsabili del 78.8% delle morti. Inoltre, tale studio ha determinato i patogeni maggiormente responsabili di AMR: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*; ciascuno di essi è stato responsabile di oltre 250.000 morti, nell'anno in esame [13].

Secondo una stima pubblicata nel report di O'Neill (???) la situazione potrebbe peggiorare esponenzialmente, se non verranno messe in atto azioni concrete: la previsione per il 2050 è di 10 milioni di morti ogni anno per cause legate all'antimicrobico resistenza

e, sul lato economico, la spesa globale correlata è stimata attorno ai 100 trilioni di dollari (USD) [2].

1.3 “One Health”

One world, one health. Tale paradigma indica il fatto che la salute umana, quella animale e quella dell’ecosistema in cui viviamo sono in stretta correlazione tra loro; è questa la base sulla quale è stato sviluppato l’approccio One Health. Dunque, si tratta di un approccio olistico, volto a progettare e migliorare i programmi di contrasto all’AMR, incrementare le politiche e le attività di ricerca in vari settori che comunicano e cooperano nell’ambito della sanità pubblica. I campi d’interesse sono la sicurezza alimentare, il controllo delle zoonosi, il contrasto dell’antimicrobica resistenza [14]. Grazie all’approccio One Health è dunque possibile una gestione multidisciplinare dell’AMR, utile al fine di delineare un quadro completo della situazione, non solo a livello umano ma anche animale e ambientale.

Molti microrganismi patogeni possono essere trasmessi dagli animali all’uomo in modo diretto (zoonosi), oppure indirettamente tramite il cibo contaminato [15;16]. A livello nazionale, uno studio pubblicato da Bonardi e collaboratori ha riportato l’identificazione di microrganismi multi-resistenti nel latte bovino [17].

Anche l’ambiente riveste un ruolo centrale nella diffusione dell’AMR. Sono numerosi i microrganismi resistenti agli antibiotici ed ubiquitari in natura, in grado di colonizzare o infettare gli animali, proliferare nelle piante, inquinare le falde acquifere, fino ad arrivare all’uomo [18].

Per tali ragioni, la sorveglianza dell’AMR deve essere eseguita su tre livelli:

- livello 1: monitoraggio del consumo di antibiotici sia per uso umano che animale;
- livello 2: monitoraggio dei tassi di resistenza agli antibiotici nei vari microrganismi;
- livello 3: analisi con metodiche di biologia molecolare, al fine di studiare le basi biologiche della resistenza.

Successivamente, i dati ottenuti devono essere integrati fra loro in modo da ottenere un quadro completo sull’epidemiologia del fenomeno.

1.4 Stewardship antimicrobica

Gli antimicrobici sono l'unica classe di farmaci il cui uso ha un impatto clinico che è potenzialmente duplice, che interessa l'individuo che assume la terapia e la comunità [19] e, per questo motivo, monitorarne l'utilizzo riveste particolare importanza nell'ambito della sanità pubblica.

Il termine inglese "stewardship" può essere reso con "supervisione o attenta gestione di qualcosa". Infatti, secondo la definizione dell'ECDC, la stewardship antimicrobica (AMS) si riferisce ad una serie di strategie ed interventi coordinati volti ad ottimizzare l'uso degli antimicrobici, in modo da promuoverne l'uso responsabile e l'appropriatezza d'impiego, massimizzarne i benefici e al contempo ridurne i rischi (tossicità, pressione selettiva sui microrganismi, sviluppo di resistenza), in maniera tale da stabilire il regime terapeutico ottimale, in termini di durata, dosaggio e via di somministrazione [19].

Tale definizione è applicabile per azioni introdotte sia a livello individuale che globale, nell'ambito della salute umana, animale e anche in ambito ambientale.

Gli obiettivi principali dei programmi di AMS sono: l'ottimizzazione dell'uso degli antimicrobici per il trattamento e la profilassi delle infezioni tra i pazienti ricoverati, al fine di migliorare i risultati clinici e preservare la loro efficacia; assicurare una terapia efficace (anche in termini di costi) e ridurre gli effetti avversi correlati all'uso degli antimicrobici; la prevenzione ed il monitoraggio dei meccanismi di resistenza; evitare l'insorgenza di infezioni difficili da trattare (le cosiddette *difficult-to-treat infections*) e ridurre l'incidenza dei microrganismi AMR. [19]

In ambito ospedaliero, il programma di AMS deve essere gestito da un gruppo di lavoro multidisciplinare. IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) ed ECDC hanno individuato le figure maggiormente coinvolte nell'attuazione di tali programmi: medici specializzati in malattie infettive, farmacisti (ospedalieri e territoriali), microbiologi. Sarebbe utile, inoltre, la figura di un epidemiologo clinico ed anche il coinvolgimento del personale infermieristico, vista la loro attività di monitoraggio costante dei pazienti. Ognuna di queste figure riveste un ruolo specifico: gli infettivologi hanno il compito di indirizzare dal punto di vista clinico e terapeutico verso la migliore gestione degli antibiotici e di fornire consulenze presso tutti i reparti clinici; la microbiologia clinica si occupa della definizione delle procedure diagnostiche, della comunicazione con le unità operative cliniche, della restituzione dei dati sulla resistenza agli antibiotici e assistenza per la loro corretta interpretazione; i farmacisti, sia clinici che territoriali, devono

informare i pazienti sull'uso dei farmaci antibiotici, notificare gli eventi avversi, partecipare alle campagne informative, fornire consulenza a pazienti e operatori sanitari su controindicazioni e interazioni e, inoltre, le farmacie ospedaliere collaborano agli *audit* sull'appropriatezza prescrittiva, svolgono attività di consulenza su dosaggio, attività di preparazione e somministrazione, monitoraggio dell'uso degli antibiotici [20].

Tuttavia, continua ad essere raro il coinvolgimento del paziente [21]. Questo è un aspetto sul quale sarebbe importante intervenire con interventi di educazione sanitaria, che mirino ad istruire i pazienti e ad aumentare la loro consapevolezza, in quanto la figura del paziente dovrebbe rivestire un ruolo cruciale, poiché è il destinatario degli interventi di AMS.

Il termine “*antimicrobial/antibiotic stewardship*” appare per la prima volta su Pubmed nel 1996. Nel decennio tra il 1990 e gli anni 2000, numerose Nazioni hanno sviluppato e implementato i loro programmi di AMS; ad oggi, vi sono delle disparità nella diffusione delle pratiche di AMS a livello globale, ciò è principalmente dovuto a fattori politici ed economici. Infatti, vi sono Stati in cui non sono disponibili linee guida per un corretto uso dei farmaci antimicrobici e in cui i programmi di sorveglianza, sia sull'uso dei farmaci che sull'insorgenza di infezioni determinate da batteri AMR, sono inconsistenti o del tutto assenti [21].

Per valutare l'efficacia degli interventi di stewardship, è necessario raccogliere e analizzare ciclicamente i dati in merito al consumo di antimicrobici, espressi come giorni di terapia e Dose Definita Die (DDD).

Al fine di monitorare l'adeguatezza degli interventi di AMS, è utile valutare anche i dati sullo sviluppo di antibiotico resistenza nei microrganismi e i dati sulla qualità degli antimicrobici utilizzati [22].

A livello nazionale, è attivo il Gruppo Italiano Stewardship Antimicrobica (GISA) il quale, nelle sue linee guida pubblicate nel 2018, delinea i punti d'intervento principali al fine di garantire l'uso appropriato degli antibiotici e monitorare l'insorgenza di ceppi batterici resistenti ad essi [23]. I concetti espressi indicano i seguenti punti di intervento:

- vaccinazione per adulti e soggetti immunodepressi;
- uso corretto della profilassi antibiotica;
- strategie per il controllo delle infezioni;
- monitoraggio dell'uso degli antibiotici in ambito veterinario;
- uso di *biomarkers* nella scelta della corretta terapia antibiotica;
- tempestiva diagnosi microbiologica;

- attenta valutazione farmacologica al fine di individuare il miglior approccio terapeutico disponibile;
- implementazione dei programmi di AMS e educazione sanitaria, rivolta sia al personale sanitario che alla popolazione.

Attualmente, è crescente l'interesse in merito ai programmi di AMS in ambito veterinario, considerato che più del 50% degli antimicrobici utilizzati a livello mondiale, vengono consumati in ambito veterinario [7]. Come già espresso, con l'approccio *One Health* viene sottolineata l'interconnessione tra uomo, animali e ambiente; dunque, anche gli approcci di stewardship devono esserlo e, per questo, è stato coniato il termine "*One Health Antimicrobial Stewardship*".

1.5 Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)

Il fenomeno dell'AMR risulta particolarmente preoccupante in ambito nosocomiale dove, per diverse concause, il rischio di infezioni da batteri multi-resistenti ha un grosso impatto in termini di incidenza e mortalità. Le infezioni correlate all'assistenza (ICA) si riferiscono a tutte le infezioni acquisite nel corso dell'assistenza, in vari ambiti assistenziali (ospedali per acuti, *day hospital/day surgery*, lungodegenze, ambulatori, assistenza domiciliare, strutture residenziali territoriali), non clinicamente manifeste o in fase d'incubazione al momento dell'ammissione [7]. Le principali ICA sono: infezioni urinarie, polmoniti, batteriemie, infezioni del sito chirurgico, infezioni da *Clostridium difficile* e sepsi neonatale [24].

Le ICA sono una delle complicanze più frequenti dell'assistenza sanitaria; tuttavia, valutarne l'impatto sui sistemi sanitari risulta essere complicato, in quanto, a differenza di altre malattie infettive acquisite in comunità, esse non possono essere rilevate attraverso sistemi di notifica "passiva", ovvero tramite la segnalazione spontanea da parte del medico curante [7]; anche l'analisi di mortalità e morbilità non è semplice poiché molto spesso le ICA vengono contratte da pazienti che hanno altre patologie in atto.

Per queste ragioni, possono essere effettuate solo delle stime sulla diffusione delle ICA, come quella riportata da Cassini e collaboratori secondo la quale, nell'Unione Europea, si verificano più di 2.5 milioni di nuovi casi di ICA ogni anno. Per quanto riguarda la mortalità, sono circa 37.000 i pazienti che muoiono come conseguenza diretta dell'infezione, e si stima che in 110.000 decessi le ICA rappresentino una concausa [24].

La crescente diffusione dei microrganismi resistenti agli antibiotici è andata di pari passo con l'aumento dei casi di ICA sostenute da batteri di questo tipo; su circa 671.000 casi di infezioni sostenute da batteri resistenti agli antibiotici verificatesi nell'anno 2015, il 63.5% di esse sono infezioni correlate all'assistenza [6; 12].

Il fenomeno dell'AMR complica notevolmente le possibilità di successo terapeutico, e, di conseguenza, tali infezioni hanno un duplice impatto, clinico ed economico. Le ICA sono caratterizzate da elevata mortalità, determinano un prolungamento della degenza, disabilità a lungo termine, e un carico economico aggiuntivo per i sistemi sanitari, per i pazienti e le loro famiglie [25; 26].

Oltre la metà delle ICA sarebbe potenzialmente prevenibile, grazie all'applicazione delle misure di controllo e prevenzione delle infezioni e ad un'elevata qualità dell'assistenza sanitaria [25].

In questo contesto rientrano i sistemi di sorveglianza: essi sono fondati sia sulla continua raccolta ed elaborazione di dati (amministrativi, di laboratorio, dei servizi farmaceutici o di dimissione ospedaliera), che su sistemi di sorveglianza attiva, indirizzati verso i pazienti a rischio di sviluppare ICA.

Al fine di attuare efficaci misure di controllo e prevenzione delle ICA, i sistemi di sorveglianza devono essere attuati a diversi livelli (internazionale, nazionale, regionale, locale). In questo modo è possibile definire le dimensioni, le caratteristiche del problema, identificare tempestivamente eventuali *outbreak*, in maniera tale da programmare gli interventi necessari, ma anche valutare l'efficacia delle eventuali misure di contrasto già in atto [7].

Il sistema di sorveglianza attivo al livello europeo, denominato HAI-net, è coordinato dall'ECDC ed ha lo scopo di monitorare la diffusione delle ICA, delinearne le caratteristiche e indirizzare gli interventi di contrasto [25].

Nello specifico, l'ECDC coordina a livello europeo le seguenti attività di sorveglianza:

- studio nazionale di prevalenza ripetuto ogni cinque anni negli ospedali per acuti;
- studio nazionale di prevalenza ripetuto ogni cinque anni nelle strutture residenziali per anziani;
- sorveglianza delle infezioni del sito chirurgico;
- sorveglianza delle infezioni in Terapia Intensiva;
- sorveglianza delle infezioni da *Clostridium difficile*.

Lo studio nazionale di prevalenza nelle strutture residenziali per anziani si è reso necessario poiché, sempre più frequentemente, l'assistenza sanitaria viene prestata anche

in ambiti diversi dall'ospedale, quali le strutture residenziali per anziani o l'assistenza domiciliare. Tali ambiti hanno caratteristiche organizzative molto diverse dall'ospedale per acuti, per cui i sistemi di sorveglianza devono necessariamente considerare queste specificità [27].

Attualmente, in Italia sono attivi programmi di sorveglianza, così come indicato dall'ECDC. Inoltre, ad essi si aggiungono la sorveglianza del consumo di soluzione idroalcolica per l'igiene delle mani, la sorveglianza per le infezioni da *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e da *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE) nonché da altri microrganismi alert.

I sistemi di sorveglianza forniscono importanti informazioni che permettono di definire l'entità del problema in Italia. Nondimeno, è importante segnalare che le metodiche utilizzate, così come gli strumenti di raccolta dati, non sono standardizzati [7]. Per tale ragione, è auspicabile un'implementazione dei sistemi a livello nazionale, al fine di garantire una raccolta dati omogenea che restituisca un quadro reale della situazione.

1.6 Microrganismi ESKAPE

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* sono i patogeni indicati con la sigla ESKAPE, responsabili della maggior parte delle infezioni correlate all'assistenza. Si tratta di un gruppo di microrganismi che, per virulenza e profilo di antibiotico resistenza, rappresentano una minaccia per la salute pubblica a livello globale. Per tale ragione, a partire dal 2017, sono stati inseriti dal World Health Organization (WHO) nella lista di patogeni per i quali la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci antibiotici sono azioni prioritarie [28], al fine di ridurre l'elevata mortalità associata: 3.57 milioni di morti associate all'AMR a livello mondiale per l'anno 2019 [13].

Particolare attenzione destano i batteri appartenenti al genere delle *Enterobacteriaceae*, spesso presenti come normali colonizzatori del tratto gastrointestinale. Tuttavia, in particolari condizioni che determinano un'alterazione del microbiota intestinale, quali la terapia antibiotica, si può verificare la selezione di ceppi batterici antibiotico resistenti che, conseguentemente, proliferano e determinano colonizzazione del tratto gastrointestinale [29; 30]. Ormai da diversi decenni, si assiste ad una rapida diffusione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE), con un elevato impatto nella sanità pubblica a livello globale.

L'epidemiologia delle CRE varia notevolmente in relazione all'area geografica che si prende in considerazione. A livello Europeo, la diffusione delle CRE è maggiore nelle nazioni del sud ed est Europa, con Italia e Grecia detentrici del primato [27]. Complessivamente, la diffusione delle CRE è particolarmente elevata nelle Nazioni del sud-est asiatico [13], seppur sia da segnalare il fatto che la loro diffusione nei Paesi in via di sviluppo è probabilmente sottostimata, a causa di una ridotta rete di sorveglianza.

Come ci è stato dimostrato dalla pandemia da COVID-19, i virus, così come i batteri, diffondono nel mondo anche grazie all'uomo. In particolare, come evidenziato da Berrazeg e collaboratori, la facilità di spostamento per fini turistici, di lavoro o gli spostamenti legati a fenomeni migratori, ha agevolato la circolazione di ceppi multi-resistenti a livello globale [31]. Tale evidenza scientifica rappresenta un chiaro esempio di come gli spostamenti delle persone siano in grado di modificare l'epidemiologia dei ceppi batterici circolanti; anche per questo, la creazione di reti di sorveglianza a livello internazionale rappresenta un valido strumento per monitorare la diffusione dei ceppi batterici antibiotico-resistenti, e dei relativi determinanti genici su larga scala, al fine di mettere in atto delle strategie d'intervento utili a contrastare il problema. In questo contesto, si inserisce l'esperienza di GLASS-AMR (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System), programma che coinvolge 109 nazioni, promosso nel 2015 dall'OMS al fine di monitorare la diffusione di determinanti di resistenza in *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus pneumoniae* isolati in campioni clinici di pazienti ospedalizzati [32].

A livello europeo, l'ECDC ha ideato il portale *Surveillance Atlas for Infectious Diseases*, tale strumento permette di monitorare la situazione epidemiologica nei territori dell'UE e dell'EAA.

1.6.1 *Klebsiella pneumoniae*

Il microrganismo *Klebsiella pneumoniae* è stato descritto per la prima volta da Carl Friedlander nel 1882; egli lo isolò dai polmoni di un paziente deceduto, in seguito ad una polmonite [33]. *K. pneumoniae* è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, che comprende altre specie di importanza clinica, tra le quali *E. coli*, *Yersinia*, *Salmonella* e *Shigella*. Non è dotato di motilità ma è provvisto di una capsula polisaccaridica che conferisce al batterio un fenotipo mucoide, quando seminato su agar.

Tale microrganismo è ubiquitario in natura; infatti, si trova nell'ambiente, incluso il terreno, le piante e le acque di superficie [34; 35]. Numerosi studi hanno descritto la sua capacità di aderire alle superfici delle attrezzature medicali [36], per tale motivo risultano particolarmente a rischio di colonizzazione/infezione da parte di *K. pneumoniae* i pazienti portatori di *device* o che vengono sottoposti a procedure mediche invasive.

Le diverse varianti circolanti di *K. pneumoniae* sono classificate sulla base del Sequence Type (ST) e del relativo Clonal Complex (CC) d'appartenenza.

Il ST è determinato dalla sequenza nucleotidica di 7 geni housekeeping: *mdh*, *infB*, *tonB*, *gapA*, *phoE*, *pgi*, e *rpoB*.

Attualmente, *K. pneumoniae* ST258, facente parte del CC258, è quella maggiormente diffusa a livello mondiale. Le analisi condotte sul genoma di *K. pneumoniae* ST258 hanno giustificato l'ampia diffusione di questo clone, probabilmente legata ad un evento di ricombinazione avvenuto tra un ceppo di *K. pneumoniae* ST11 e uno appartenente al ST442; inoltre, è stato possibile evidenziare che il genoma di *K. pneumoniae* ST258 presenta un'omologia di sequenza pari all'80% con quello di *K. pneumoniae* ST11 [37; 38].

Studi condotti mediante sequenziamento genico stanno diventando sempre più frequenti e vantaggiosi, in quanto risultano particolarmente utili al fine di approfondire le conoscenze in merito alle caratteristiche dei microrganismi in esame. Nel caso di *K. pneumoniae*, suddetti studi hanno permesso di ipotizzare che gli eventi di ricombinazione possano determinare cambiamenti nelle caratteristiche del microrganismo, tali da agevolarne la sopravvivenza e la diffusione.

In letteratura, è frequente la distinzione dei ceppi di *K. pneumoniae* in tre categorie: *K. pneumoniae* classica, *K. pneumoniae* ipervirulenta e *K. pneumoniae* antibiotico resistente. *K. pneumoniae* classica (C-Kp): ampiamente diffusa a livello mondiale; è responsabile di infezioni principalmente nei soggetti con comorbidità, immunodepressi e/o nella popolazione anziana; principalmente, è diffusa in ambito nosocomiale.

K. pneumoniae ipervirulenta (HV-Kp): identificata a Taiwan negli anni '80, ha la capacità di diffondersi anche in ambiente comunitario e di causare infezioni, non solo nei soggetti il cui sistema immunitario è compromesso, ma anche in individui sani e di giovane età; tali infezioni sono spesso invasive, inclusi casi di ascesso epatico, polmoniti, endoftalmiti, meningiti e fascite necrotizzante, tutte caratterizzate da elevata mortalità [39; 40; 41].

La virulenza è determinata dall'acquisizione di plasmidi, generalmente di 200-220 kb, contenenti geni che codificano per siderofori, ovvero molecole in grado di chelare il ferro

(ne è un esempio il gene *iuc*, che codifica per l'aerobactina), e geni che determinano mutazioni a livello della capsula polisaccaridica del microrganismo (*rmpA* e *rmpA2*) [42], le quali aumentano la capacità di HV-Kp di sopravvivere nell'organismo ospite. I due principali plasmidi responsabili di ipervirulenza fino ad ora identificati sono PK2044 e pLVPK [43].

Un tratto fenotipico che può essere presente in HV-Kp è l'ipermucoviscosità; essa può essere determinata tramite lo "string test": poggiando un'ansa sulla patina di colonia batterica e sollevandola lentamente si nota la formazione di un filamento viscoso che arriva a più di 5mm [44]. È importante sottolineare che non tutti i ceppi di HV-Kp possiedono tale caratteristica; dunque, non è un suo tratto esclusivo. A riprova di ciò, nel corso degli ultimi anni sono stati pubblicati dei report in merito all'identificazione di ceppi di *K. pneumoniae* resistenti agli antibiotici e con fenotipo ipermucoviscoso [45].

Per quanto riguarda la sua diffusione a livello globale, HV-Kp è endemica soprattutto nelle nazioni del Sud Est asiatico: in Korea del Sud il tasso di colonizzazione è del 4.6%, mentre risulta essere più elevato in Malesia, Singapore, Taiwan e Cina (14.1%, 14.9%, 11.3%, 11.7%, rispettivamente) [43]; tuttavia, sono stati segnalati casi anche in Nord America [46].

K. pneumoniae antibiotico resistente: nel corso dei decenni, il tasso di resistenza agli antibiotici da parte di tale microrganismo è cresciuto notevolmente, con differenze significative a livello geografico (Figura 1) [13; 27].

Conseguentemente allo sviluppo di tale fenomeno, le infezioni mediate da *K. pneumoniae* risultano difficili da trattare e, pertanto, presentano un elevato tasso di mortalità che, per i pazienti ricoverati in Terapia Intensiva, arriva al 50% [47; 48].

Per quanto riguarda i principali meccanismi di antibiotico resistenza osservati in *K. pneumoniae*, essi possono essere distinti in:

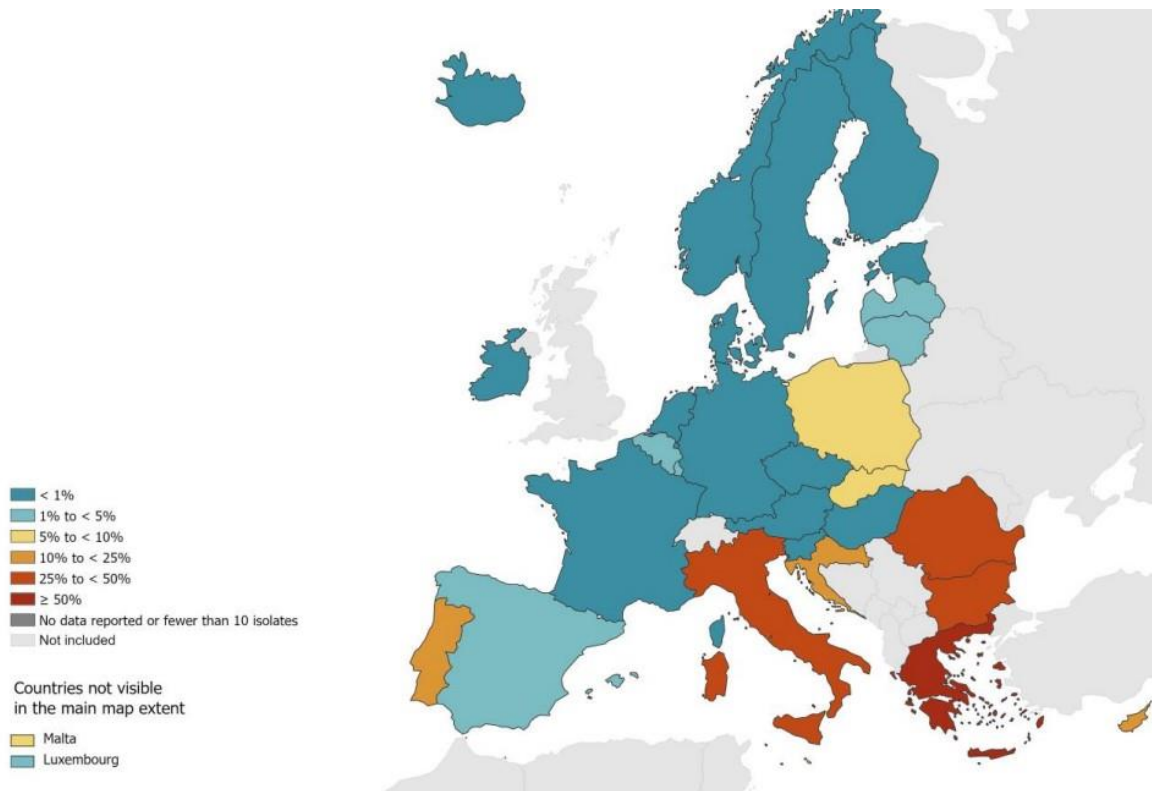
- espressione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL, *Extended Spectrum β -Lactamases*), che determinano la resistenza a cefalosporine e monobattami;
- espressione di carbapenemasi: si tratta di enzimi in grado di catalizzare la reazione di idrolisi degli antibiotici β -lattamici, distinti in base alla loro struttura molecolare in diverse classi (classificazione di Ambler).

L'espressione di carbapenemasi è senz'altro il meccanismo di resistenza più preoccupante, in quanto, causando l'idrolisi degli antibiotici β -lattamici, compresi i carbapenemi, ne determina la perdita di efficacia.

Questi ultimi antibiotici sono una categoria di farmaci utilizzati per il trattamento delle infezioni sostenute sia da batteri Gram-negativi che Gram-positivi. Sono stati spesso, vengono definiti “*last-resort antibiotics*”, cioè farmaci di ultima scelta poiché vengono utilizzati in caso di infezioni da microrganismi multi-farmaco resistenti, in cui non sia disponibili altri approcci terapeutici [49].

Un elemento che desta particolare preoccupazione è l’identificazione di ceppi batterici dotati sia di antibiotico resistenza che di fattori di virulenza, presenti nello stesso plasmide o in plasmidi differenti all’interno dello stesso ceppo batterico [50; 51]. Lo sviluppo e la diffusione di tali cloni può dare origine ad *outbreak* in ambito nosocomiale, come riportato da Gu e collaboratori, i quali hanno descritto un *outbreak* causato da un ceppo di *K. pneumoniae* ST11, ipervirulento ed antibiotico resistente, responsabile di polmonite associata alla ventilazione assistita (VAP), nella terapia intensiva dell’ospedale di Hangzhou (Cina), in cui tutti i cinque pazienti coinvolti sono deceduti durante il ricovero, a causa dello shock settico determinato dall’infezione [52].

Figura 1: Diffusione di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi in Europa, 2020.



1.6.1.1 Colonizzazione e infezione da *K. pneumoniae*

K. pneumoniae si comporta da patogeno opportunisto, in grado di colonizzare il tratto gastrointestinale (GI) e l'orofaringe nell'uomo; da tali distretti corporei, il microrganismo può spostarsi, proliferare in altri tessuti e determinare infezioni quali polmonite, infezioni del tratto urinario, ascesso epatico, sepsi e meningite specialmente in soggetti immunodepressi [53].

Nella cavità orale, i macrofagi e i neutrofili, normalmente presenti, rilasciano specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO) che contrastano la proliferazione batterica, in quanto sono in grado di danneggiare la parete cellulare dei Gram-negativi. Tuttavia, grazie al processo di fermentazione, *K. pneumoniae* produce H_2 che neutralizza gli effetti delle ROS e del NO [54], consentendole di proseguire lungo il tratto digerente, fino ad arrivare nella parte inferiore del tratto GI, dove, grazie alle *fimbriae* di cui è dotata, aderisce alla mucosa, determinando la colonizzazione di tale distretto corporeo [55].

È importante notare che nel tratto gastrointestinale risiedono una grande quantità di batteri, circa 10¹² cfu/ml e che la maggior parte di essi sono concentrati nella parte inferiore [56]. Fra tali microrganismi, i batteri Gram-negativi sono quelli maggiormente coinvolti nella conseguente insorgenza di patologie [57].

Il tasso di colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte di *K. pneumoniae* risulta essere più elevato nei pazienti ricoverati, rispetto al resto della popolazione. Podschun e Ullmann hanno riportato un tasso di colonizzazione pari al 77%, tra i soggetti ricoverati [58]. Questo è un dato variabile, in quanto cambia in relazione alla zona geografica considerata, poiché, come già enunciato, ci sono parti del mondo in cui la diffusione di tale microrganismo è endemica e altre in cui è meno diffusa; inoltre anche eventuali trattamenti antibiotici messi in atto possono influire sul tasso di colonizzazione riscontrato: infatti, è stato dimostrato che la terapia antibiotica riduce drasticamente la diversità della popolazione batterica presente nel tratto GI, aumentando, al contempo, quella dei microrganismi antibiotico resistenti [59].

Uno studio del 2016 condotto dall'University of Michigan Health System ha individuato un tasso di colonizzazione GI pari al 23% tra la popolazione oggetto dello studio [60], simile a quanto rilevato in un recente studio, condotto a Taiwan e pubblicato nel 2022, in cui il tasso di colonizzazione riscontrato era del 26% [61]. Considerando la sola popolazione composta da pazienti ospedalizzati, si conferma un tasso di colonizzazione da parte di *K. pneumoniae* maggiore, in particolare nei pazienti ricoverati nei reparti di Terapia Intensiva (TI) [62], come riportato da Gorrie e collaboratori, in cui il tasso di colonizzazione nei pazienti ricoverati in TI e in ambito comunitario era rispettivamente del 19% e 5.9% [63]. Anche la mortalità risulta essere più elevata nei pazienti colonizzati e ricoverati in TI, con un range variabile tra 24% e 41% [64-66]. Ne consegue, che i pazienti ricoverati in TI costituiscono una popolazione a rischio di colonizzazione GI e di infezione e, per tale ragione, sono sottoposti a programmi di screening, atti ad individuare in maniera tempestiva eventuali casi di colonizzazione e mettere in pratica tutte le norme di controllo e contenimento della diffusione.

È stato dimostrato che tra il 16.5% e il 50% dei pazienti colonizzati da CRE sviluppano infezione entro 30 giorni dal primo tampone rettale positivo [62; 67]. Tuttavia, l'esatto meccanismo di progressione dalla condizione di colonizzazione ad infezione non è ancora del tutto chiaro. Rao e collaboratori, in uno studio pubblicato nel 2021, riportano che l'80% dei casi di infezione da loro riscontrati erano stati determinati dallo stesso ceppo responsabile della colonizzazione, con un tempo medio di progressione da colonizzazione ad infezione di 11.5 giorni [68].

In tale contesto, *K. pneumoniae* è uno dei principali microrganismi a livello globale responsabile di diverse forme di ICA, il 19.9% delle morti legate all'AMR, avvenute nel 2019, sono state causate da tale microrganismo [3]. Nello specifico è responsabile di:

polmonite batterica, con formazione di ascessi che determinano la rapida distruzione del parenchima polmonare; bronchite; VAP, polmonite associata alla ventilazione meccanica, che si manifesta almeno dopo 48 ore dalla intubazione endotracheale; infezioni del torrente ematico; infezione del tratto urinario (UTI), generalmente associate a catetere; infezioni dei tessuti molli.

1.6.1.2 Fattori di rischio

Stabilire quali siano i fattori di rischio che concorrono al successivo sviluppo di colonizzazione ed infezione da sostenute da *K. pneumoniae* è fondamentale, al fine di determinare quali siano i pazienti a rischio e, conseguentemente, mettere in atto efficaci misure di controllo e prevenzione delle infezioni per limitare la diffusione di tali microrganismi.

Fra questi, età, immunosoppressione, comorbidità (COPD, diabete mellito, insufficienza renale cronica, indice di Charlson>3) terapia antibiotica (principalmente con carbapenemi e fluorochinoloni), ricovero in terapia intensiva, essere sottoposti ad interventi chirurgici o a procedure mediche invasive (tracheotomia, ventilazione meccanica, utilizzo di cateteri) sono dei fattori di rischio ben stabiliti [60; 69].

Inoltre, a sua volta, la stessa condizione di colonizzazione da CRE rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di una conseguente infezione, sostenuta dallo stesso microrganismo [64; 70]. La metanalisi condotta da Tischendorf e collaboratori, su 1806 pazienti colonizzati da CRE, ha permesso di calcolare un rischio di contrarre un'infezione sistemica da CRE pari al 16.5%; tale rischio aumenta considerevolmente per i pazienti ricoverati in TI, variando tra il 29% e il 73% [62].

Ciò sottolinea l'importanza dei programmi di screening nel determinare tempestivamente i casi di colonizzazione, in maniera tale da attuare le opportune misure d'isolamento del paziente colonizzato; inoltre, la caratterizzazione del ceppo responsabile di colonizzazione può rivelarsi utile nell'indirizzare la scelta terapeutica, in caso di conseguente infezione sostenuta dallo stesso microrganismo [60].

1.7 Meccanismi responsabili di antibiotico resistenza

I microrganismi possono essere dotati di resistenza intrinseca oppure possono sviluppare resistenza acquisita [71].

La resistenza intrinseca si ha quando un microrganismo è naturalmente resistente ad un antibiotico, mentre, la resistenza acquisita può insorgere in seguito all'esposizione ai farmaci, quando si ha la cosiddetta "pressione selettiva". Quest'ultima può essere principalmente determinata da tre meccanismi principali: mutazione, trasferimento genetico verticale, trasferimento genetico orizzontale. I suddetti meccanismi possono determinare: l'aumentata estrusione del farmaco dalla cellula batterica; l'aumento del metabolismo enzimatico del farmaco, con conseguente perdita o riduzione della sua attività; la ridotta permeabilità del farmaco all'interno della cellula batterica.

In seguito all'uso spesso errato ed eccessivo degli antibiotici, numerosi batteri hanno sviluppato dei meccanismi di resistenza nei loro confronti. Fra essi vi sono una serie di microrganismi responsabili di infezioni correlate all'assistenza che, per diffusione e letalità delle infezioni che determinano, sono oggetto di monitoraggio: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Enterobacterspp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonellaspp.*, *Serratiaspp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae*.

Per indicare i batteri che hanno sviluppato AMR, e che frequentemente sono dotati anche di una maggiore virulenza, è stato coniato il termine inglese "superbugs" [71].

I meccanismi responsabili di AMR possono essere suddivisi in quattro categorie:

1. inattivazione o alterazione del farmaco antimicrobico;
2. mutazioni del bersaglio nella cellula batterica;
3. riduzione della penetrazione o dell'accumulo del farmaco all'interno della cellula batterica;
4. formazione di biofilm.

1.7.1 Inattivazione o alterazione del farmaco antimicrobico

Fra i patogeni ESKAPE risulta particolarmente comune la produzione di enzimi responsabili di inattivazione o alterazione del farmaco antimicrobico; nello specifico, tale

meccanismo è quello prevalente nei batteri Gram-negativi. L'azione enzimatica è mirata a distruggere il sito attivo del farmaco (per esempio idrolisi dell'anello β -lattamico ad opera degli enzimi β -lattamasi), oppure a modificare in modo covalente specifici gruppi funzionali del farmaco in maniera tale da ostacolarne l'interazione con il bersaglio nella cellula batterica (ne sono un esempio le reazioni a carico dei gruppi idrossilici o aminici degli amminoglicosidi, catalizzate dall'enzima modificante gli amminoglicosidi, AME). Una classe di enzimi che determinano antibiotico resistenza con tale meccanismo sono le β -lattamasi; la prima β -lattamasi fu identificata in un ceppo di *E. coli*, subito dopo la scoperta della penicillina [72]. Ad oggi, ne sono state identificate più di 2600. Tali enzimi catalizzano la reazione di idrolisi dell'anello β -lattamico presente negli antibiotici β -lattamici, con conseguente perdita della loro attività antimicrobica [73]. Nel contesto dell'AMR, il loro studio è particolarmente importante poiché le β -lattamasi rappresentano il più importante e comune meccanismo di resistenza tra i batteri Gram-negativi del gruppo ESKAPE.

Le β -lattamasi sono classificate in quattro classi (A, B, C, D), in base alla loro struttura primaria, secondo la "Classificazione di Ambler" [74].

Gli enzimi di classe A sono dotati di un residuo di serina nel loro sito attivo; comprendono: penicillinasi, cefalosporinasi, β -lattamasi a ridotto spettro, β -lattamasi ad ampio spettro, β -lattamasi a spettro esteso (dall'inglese *Extended Spectrum β -Lactamases*, indicate con la sigla ESBL), e carbapenemasi. Essi sono il gruppo più numeroso ed esplicano la loro azione idrolitica su numerosi antibiotici β -lattamici (penicilline, cefalosporine fino alla terza generazione, monobattami, cefamicine ed anche carbapenemi). L'attività inibitoria dell'acido clavulanico e del tazobactam nei confronti di tale classe enzimatica è piuttosto varia; invece, essi vengono inibiti con successo da avibactam, relebactam e vaborbactam, inibitori delle β -lattamasi di recente immissione in commercio [75]. Alla classe A appartiene la carbapenemasi KPC: si tratta di una carbapenemasi codificata da plasmidi, la cui espressione, principalmente in *Klebsiella pneumoniae*, è stata associata a numerosi outbreak nosocomiali in tutto il mondo [76]. È stata identificata per la prima volta nel 1996 in USA in un ceppo di *K. pneumoniae*, isolato nell'ambito di un programma di sorveglianza dell'antimicrobico resistenza nei reparti di terapia intensiva [77]. Ad oggi, KPC è ancora la carbapenemasi maggiormente diffusa e, finora, le varianti maggiormente caratterizzate sono KPC-2 e KPC-3 [76]. L'epidemiologia di KPC è varia dal punto di vista geografico: le nazioni in cui tale carbapenemasi è considerata endemica sono USA, Cina, Taiwan, Italia, Grecia, Israele,

Polonia, Brasile, Argentina e Colombia [78]. Tuttavia, sono stati riportati in letteratura numerosi casi di identificazione di microrganismi ESKAPE produttori di KPC in numerose nazioni europee, a riprova del fatto che le persone, viaggiando da una nazione ad endemismo elevato verso un'altra, possono mediare anche la diffusione dei patogeni. In letteratura è riportata l'efficacia delle terapie d'associazione di recente introduzione in commercio, imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam e ceftazidime/vaborbactam, nei confronti dei batteri Gram-negativi produttori di KPC [79]. Tuttavia, un aspetto che desta particolare preoccupazione è l'aumento di casi in cui si registra l'insorgenza di resistenza a ceftazidime/avibactam nei ceppi di *Klebsiella pneumoniae* ST258; tale resistenza è mediata dall'espressione di varianti di KPC, in particolare la variante KPC-3 [80].

Gli enzimi di classe B sono metallo β -lattamasi (MBLs), richiedono la presenza di una molecola di Zn^{2+} nel loro sito attivo e, così come gli enzimi di classe A, sono codificati da plasmidi; le MBLs sono dotate di una forte attività idrolitica verso la maggior parte degli antibiotici β -lattamici, inclusi i carbapenemi, ma non per i monobattami [81].

Appartengono a tale classe le carbapenemasi VIM, IMP e NDM. VIM e IMP sono state isolate per la prima volta in *Pseudomonas aeruginosa*, ad oggi sono diffuse anche in altre specie batteriche, tra cui *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp* ed *E. cloacae* complex. Per quanto riguarda le MBLs di tipo NDM, esse sono state riscontrate in tutti i batteri Gram-negativi del gruppo ESKAPE. La prima identificazione risale al 2008, quando NDM fu identificata in un ceppo di *K. pneumoniae* ed in uno di *E. coli*, responsabili di un'infezione delle vie urinarie contratta da un paziente svedese durante un viaggio in India [82]; da allora, a partire dal subcontinente indiano, dove NDM è endemica, si è assistito alla diffusione di *K. pneumoniae* NDM in numerose aree del mondo: USA, Canada, Colombia, Francia, Italia, Grecia, Taiwan, Cina, Giappone, sottolineando l'ampia diffusione a livello mondiale [83]. Un ulteriore dato, particolarmente allarmante, è la presenza di elementi genetici mobili che recano sia le sequenze codificanti per NDM che per ulteriori determinanti di resistenza ad altri farmaci antimicrobici, conferendo al batterio in cui vengono espresse un profilo di multi-farmaco resistenza che riduce notevolmente le opzioni terapeutiche disponibili e, in alcuni casi, non permette l'uso di alcun farmaco [83].

Al gruppo C appartengono le cefalosporinasi, enzimi espressi a livello cromosomico in numerose *Enterobacteriaceae*, in *P. aeruginosa* e in *Acinetobacter spp.*; inoltre, la presenza di cefalosporinasi codificate a livello plasmidico è stata riscontrata in *K.*

pneumoniae, come evidenziato da Jacoby [84]. Tali enzimi esplicano la loro attività verso le cefalosporine a spettro ristretto e a spettro intermedio, sono invece resistenti all'acido clavulanico. Generalmente, la loro espressione a livello costitutivo è bassa ma può venire indotta in seguito a terapia antibiotica, determinando un profilo di resistenza rilevante dal punto di vista clinico [85].

Ultimo gruppo della classificazione di Ambler è la classe D. Essa comprende oltre 400 enzimi denominati OXA (*oxacillin hydrolyzing enzymes*), in quanto idrolizzano le isossazolilpenicilline (oxacillina e suoi derivati) in maniera più efficace delle benzilpenicilline [86].

L'enzima più diffuso, e conseguentemente, maggiormente noto, appartenente a questa categoria è OXA-48: dotato di attività idrolitica verso le amminopenicilline, le ureidopenicilline, le carbossipenicilline, i carbapenemi e le cefalosporine a spettro ristretto, ma non verso le cefalosporine a spettro esteso [86]; è stato identificato per la prima volta nel 2003 in Turchia, in un ceppo di *K. pneumoniae* [87]. Anche in questo caso, nel corso degli anni si sono susseguiti i report in merito alla diffusione di tale carbapenemasi a livello mondiale: Turchia, Arabia Saudita, Marocco, Libia, Tunisia, Egitto, India sono le nazioni in cui la diffusione di OXA-48 è considerata endemica, mentre casi sporadici ed *outbreaks* nosocomiali sono segnalati in Europa (Italia, Grecia, Germania, Francia, Spagna, Belgio, Olanda Irlanda) e in altre nazioni come Argentina, Libano, Israele, Cina, Taiwan, Giappone; attualmente, è possibile affermare che anche OXA-48 è diffusa a livello globale [86].

I plasmidi codificanti per la carbapenemasi OXA-48 sono stati identificati in numerose *Enterobacteriaceae*, quali *E. coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* [88]; ciò sottolinea l'abilità di tali plasmidi di diffondere in varie specie batteriche, tramite il trasferimento genico orizzontale. Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione è la co-espressione di ESBLs o di altre carbapenemasi in ceppi produttori di OXA-48, conferendo ulteriore resistenza alla maggior parte degli antibiotici β -lattamici disponibili [86; 88].

1.7.1.1 Produzione di carbapenemasi in *K. pneumoniae*

Il primo caso di *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi (cp-Kp) è stato identificato nel 1996 in North Carolina (USA), l'enzima fu denominato KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) [77]. Ad oggi, KPC-2 e KPC-3 sono le carbapenemasi maggiormente diffuse. Anche le carbapenemasi di classe B, NDM, VIM, IMP, e quelle di classe D,

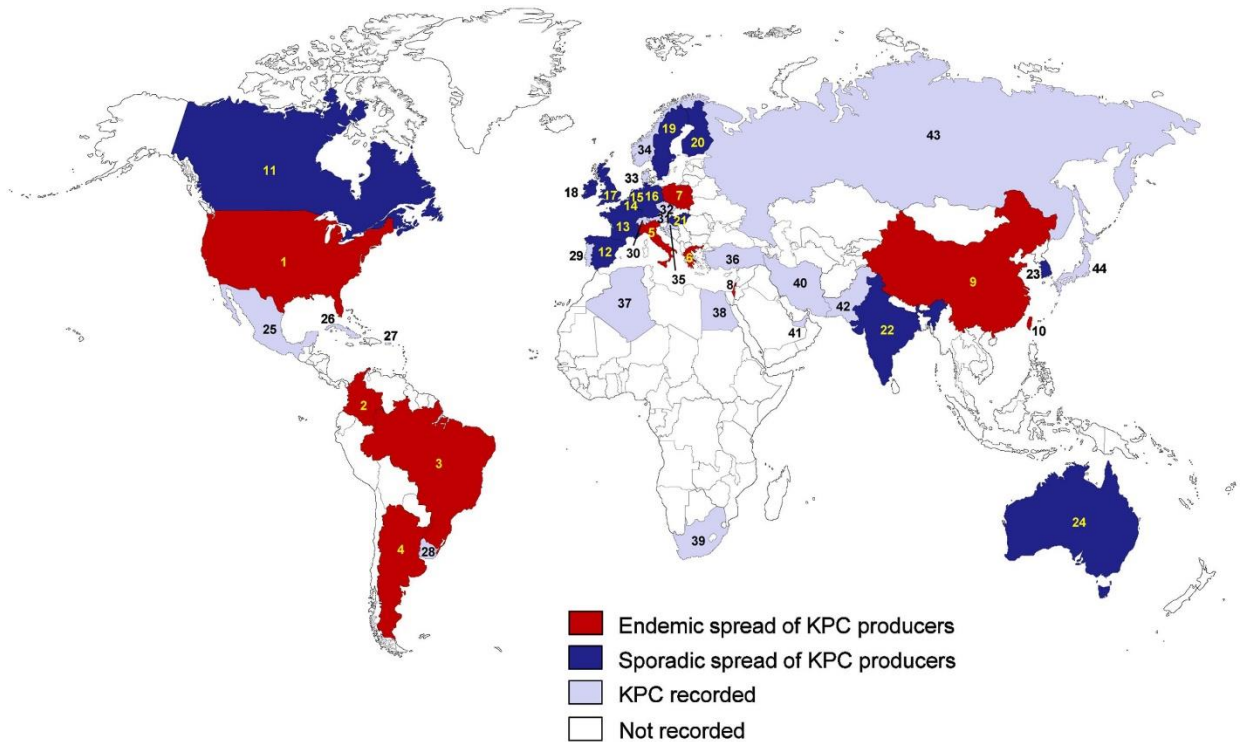
OXA-48, sono state identificate nei ceppi di *K. pneumoniae*. La prima identificazione di NDM risale al 2008, in Svezia, quando tale enzima fu isolato sia in un ceppo di *E. coli* che in uno di *K. pneumoniae* in un paziente di ritorno dall'India. Per quanto riguarda le carbapenemasi di classe D, OXA-48 è l'enzima dotato di maggiore attività idrolitica appartenente a tale classe; è stato isolato per la prima volta in un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* in Turchia nel 2001 [89].

Attualmente, sono evidenziabili differenze in merito alla diffusione dei ceppi di cp-Kp a livello globale, (figura 2): *K. pneumoniae* produttrice di KPC è endemica in numerose nazioni europee (Spagna, Francia, Germania, Italia, Irlanda, Belgio, Svezia e Finlandia) e in varie nazioni del Pacifico (Cina, India, Corea del Sud, Australia) [78].

L'identificazione sporadica delle carbapenemasi di classe B è stata segnalata negli Stati Uniti [90], in Canada [91], in Italia [92], Spagna [93], Francia [94], Grecia [95], Regno Unito [96], e nelle nazioni del Pacifico (Taiwan, Cina, Giappone e Corea del Sud) [97; 98], mentre sono considerate endemiche in India, Pakistan e Bangladesh [96] (figura 3). Diversamente, le carbapenemasi di classe D sono endemiche nelle nazioni del Medio Oriente, Marocco, Libia, Egitto, Algeria e Tunisia [99]; ulteriori casi sono stati segnalati in Francia [100], Italia [101], Belgio [102] Germania [103], Regno Unito [104], Giappone [105] (figura 4).

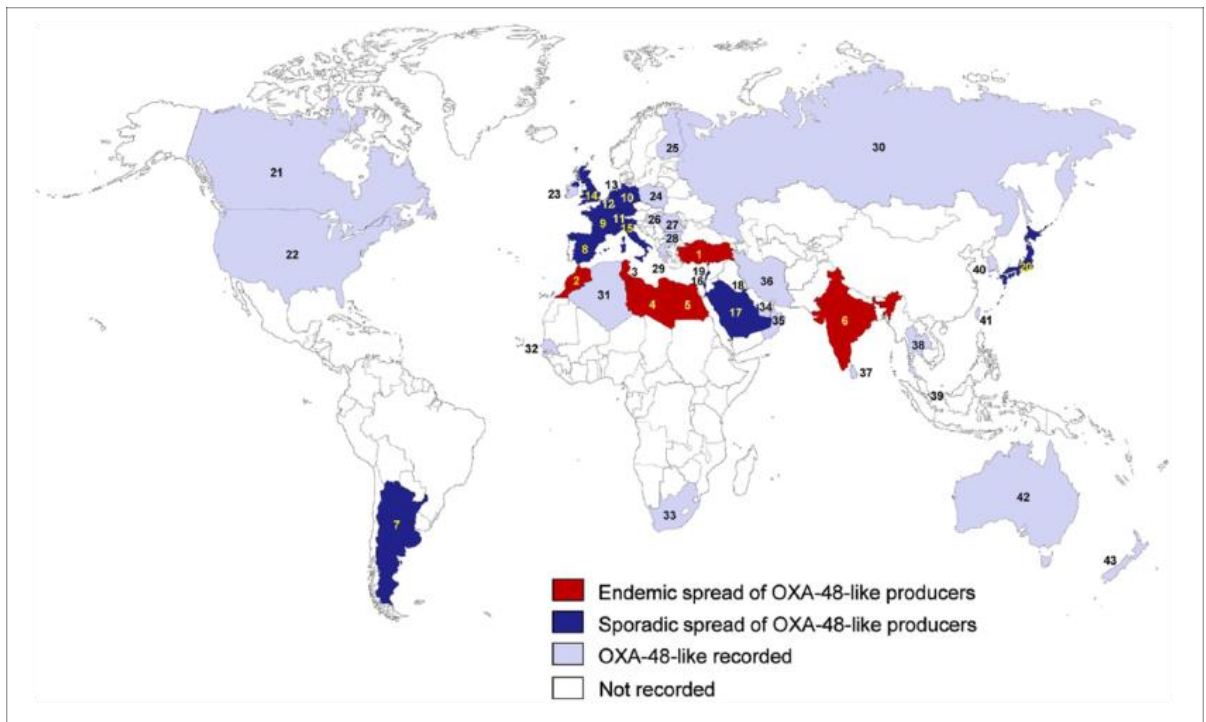
Come sottolineato da O'Neill nel report pubblicato nel 2016, noi tutti viviamo in un mondo sempre più collegato in cui persone, animali, merci e con essi anche i microrganismi si spostano liberamente tra le nazioni [2]. Conseguentemente, gli spostamenti di individui colonizzati da microrganismi produttori di carbapenemasi sono senz'altro un fattore che agevola la diffusione di tali ceppi nelle varie nazioni, rendendo il quadro epidemiologico soggetto a variazioni. Anche per tale ragione, affinché si attui un serio ed efficace contrasto dell'AMR, è necessaria un'azione coordinata a livello internazionale.

Figura 2: diffusione globale di *K. pneumoniae* produttrice di KPC.



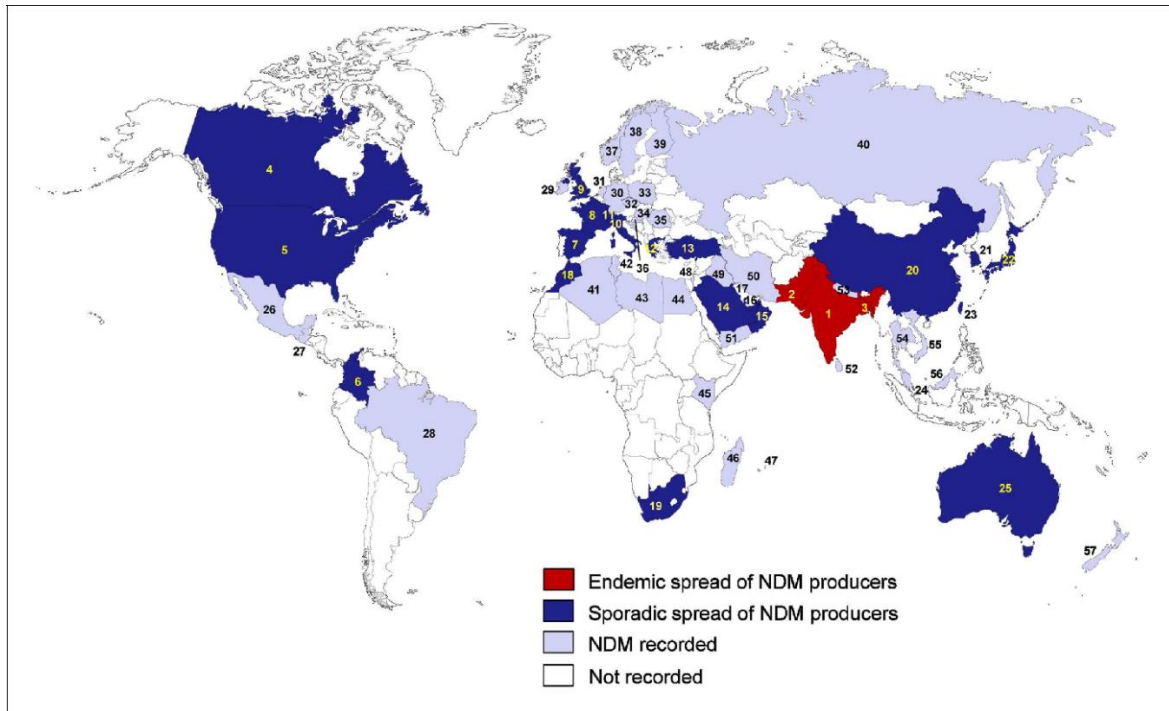
(1) USA; (2) Colombia; (3) Brasile; (4) Argentina; (5) Italia; (6) Grecia; (7) Polonia; (8) Israele; (9) Cina; (10) Taiwan; (11) Canada; (12) Spagna; (13) Francia; (14) Belgio; (15) Paesi Bassi; (16) Germania; (17) Regno Unito; (18) Irlanda; (19) Svezia; (20) Finlandia; (21) Ungheria; (22) India; (23) Corea del Sud; (24) Australia; (25) Messico; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguay; (29) Portogallo; (30) Svizzera; (31) Austria; (32) Repubblica Ceca; (33) Danimarca; (34) Norvegia; (35) Croazia; (36) Turchia; (37) Algeria; (38) Egitto; (39) Sud Africa; (40) Iran; (41) Emirati Arabi Uniti; (42) Pakistan; (43) Russia; (44) Giappone.

Figura 3: diffusione globale di *K. pneumoniae* produttrice di OXA-48.



(1) USA; (2) Colombia; (3) Brasile; (4) Argentina; (5) Italia; (6) Grecia; (7) Polonia; (8) Israele; (9) Cina; (10) Taiwan; (11) Canada; (12) Spagna; (13) Francia; (14) Belgio; (15) Paesi Bassi; (16) Germania; (17) Regno Unito; (18) Irlanda; (19) Svezia; (20) Finlandia; (21) Ungheria; (22) India; (23) Corea del Sud; (24) Australia; (25) Messico; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguay; (29) Portogallo; (30) Svizzera; (31) Austria; (32) Repubblica Ceca; (33) Danimarca; (34) Norvegia; (35) Croazia; (36) Turchia; (37) Algeria; (38) Egitto; (39) Sud Africa; (40) Iran; (41) Emirati Arabi Uniti; (42) Pakistan; (43) Russia; (44) Giappone.

Figura 4: diffusione globale di *K. pneumoniae* produttrice di NDM.



(1) USA; (2) Colombia; (3) Brasile; (4) Argentina; (5) Italia; (6) Grecia; (7) Polonia; (8) Israele; (9) Cina; (10) Taiwan; (11) Canada; (12) Spagna; (13) Francia; (14) Belgio; (15) Paesi Bassi; (16) Germania; (17) Regno Unito; (18) Irlanda; (19) Svezia; (20) Finlandia; (21) Ungheria; (22) India; (23) Corea del Sud; (24) Australia; (25) Messico; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguay; (29) Portogallo; (30) Svizzera; (31) Austria; (32) Repubblica Ceca; (33) Danimarca; (34) Norvegia; (35) Croazia; (36) Turchia; (37) Algeria; (38) Egitto; (39) Sud Africa; (40) Iran; (41) Emirati Arabi Uniti; (42) Pakistan; (43) Russia; (44) Giappone.

1.7.2 Mutazioni del bersaglio nella cellula batterica

Tale meccanismo di resistenza consiste nel determinare la riduzione dell'affinità tra farmaco e bersaglio o la totale mancanza di interazione tra i due. I microrganismi appartenenti al gruppo ESKAPE possono agire tramite diversi meccanismi, tra cui: mutazione dell'enzima bersaglio, alterazioni a carico dei ribosomi, alterazioni a carico della parete cellulare batterica.

Mutazione dell'enzima bersaglio. Ne è un esempio la sintesi di PBP (*Penicillin Binding Protein*) mutate che non consente il legame farmaco-proteina, di conseguenza batteri che esprimono PBP mutate saranno resistenti agli antibiotici β -lattamici.

Alterazioni a carico dei ribosomi. Le metiltransferasi sono enzimi che catalizzano la metilazione delle subunità ribosomiali; conseguentemente a tale reazione, il farmaco antimicrobico non riesce a legare il sito bersaglio sulla subunità ribosomiale. Ad oggi, sono state identificate 10 metiltransferasi che catalizzano la metilazione della subunità ribosomiale 16S; inoltre, Doi e collaboratori hanno evidenziato il fatto che tali enzimi

sono spesso codificati da plasmidi che recano anche altri determinanti di resistenza (OXA-like, NDM) [107], ciò determina un profilo di multi-farmaco resistenza e, di conseguenza, riduce ulteriormente le opzioni terapeutiche disponibili.

Alterazioni a carico della parete cellulare batterica. Tale meccanismo risulta essere più comune nei batteri ESKAPE gram-positivi, come *E. faecium* ed *E. faecalis*, in cui la presenza del gene vanA e/o vanB determina resistenza ai glicopeptidi, farmaci antimicrobici responsabili dell'inibizione della sintesi della parete cellulare batterica [108].

1.7.3 Riduzione della penetrazione e dell'accumulo di antibiotico nella cellula batterica

Le mutazioni a carico delle porine o delle pompe di efflusso rappresentano un ulteriore meccanismo di AMR tra i patogeni ESKAPE Gram-negativi.

Le porine sono canali proteici localizzati sulla membrana cellulare esterna, che consentono il trasporto di acqua, ioni e molecole idrofile (fra cui i β -lattamici e alcuni antibiotici appartenenti alla classe dei fluorochinoloni) verso l'interno della cellula [109]. Di conseguenza, mutazioni a loro carico che ne determinano la ridotta espressione, la perdita di funzionalità e/o la mancata sintesi concorrono ad ostacolare l'ingresso del farmaco nell'ambiente intracellulare [37].

È stato dimostrato che tali mutazioni possono essere indotte dalla terapia farmacologica in atto [49]. Tale evento è stato dimostrato per i geni *omp35* ed *omp36*, codificanti per le porine Ompk35 e OmpK36; in seguito a terapia antibiotica *K. pneumoniae* ed *Enterobacter* hanno la capacità di alterare la sintesi di tali porine: la sintesi di OmpK35 può venire interrotta oppure può essere sostituita dalla produzione di OmpK36, che presenta un canale più stretto, ostacolando quindi il passaggio di molecole di grandi dimensioni; inoltre la stessa sintesi di Ompk36 può venire alterata, a causa di una specifica mutazione che induce la produzione della porina OmpK36GD, che presenta un'alterata capacità di influsso delle molecole [80].

Per quanto riguarda le pompe batteriche di efflusso, esse operano l'estrusione del farmaco dall'ambiente intracellulare; i geni codificanti per le pompe di efflusso possono essere localizzati in cromosomi o in elementi genetici mobili [80].

Ad oggi, ne sono state identificate sei famiglie:

- RDN, *Resistance Nodulation Division*;
- MFS, *Major Facilitator Superfamily*;

- MATE, *Multidrug And Toxic compound Extrusion*;
- SMR, *Small Multidrug Resistance*;
- ABC, *ATP-Binding Cassette*;
- PACE, *Proteobacterial antimicrobial compound efflux*.

Le suddette classi sono tutte espresse dai patogeni ESKAPE, con alcune differenze di specificità in relazione al substrato. Ad esempio, la pompa di efflusso AcrAB-TolC, classificata come membro della famiglia RDN, è tipicamente espressa nei ceppi di *K. pneumoniae* ed *Enterobacter* multiresistenti.

1.7.4 Formazione di biofilm

La formazione di biofilm su una superficie (biologica o abiotica) avviene quando popolazioni cellulari batteriche si aggregano fra loro e si organizzano in un ambiente extra-cellulare che costituisce la matrice del biofilm; tale capacità risulta essere particolarmente rilevante per la proliferazione batterica nelle superfici di cateteri e *devices* [109].

Anch'essa rappresenta un meccanismo di resistenza, in quanto il biofilm impedisce al farmaco antimicrobico di entrare in contatto con il patogeno. Secondo il *National Institute of Health* [110] il 70-80% delle infezioni diagnosticate nell'uomo sono sostenute da batteri formanti biofilm; nella maggior parte dei casi, si tratta di infezioni croniche, in cui risulta difficile eradicare l'agente eziologico.

La formazione di biofilm avviene in molteplici fasi: inizialmente si ha l'adesione delle cellule alla superficie, mediata dall'azione dei pili; successivamente si formano delle piccole colonie batteriche che, nel tempo, maturano e conseguentemente si propagano, dando vita ad una popolazione cellulare vitale in ambiente extra-cellulare [110].

I fattori coinvolti nella ridotta suscettibilità agli antibiotici riscontrata nelle popolazioni cellulari di un biofilm sono molteplici. Infatti, risulta avere un ruolo determinante non solo la specie batterica che determina la formazione del biofilm, ma anche il tipo di farmaco antimicrobico somministrato e le condizioni ambientali [80].

Fra i batteri Gram-negativi, *K. pneumoniae* è in grado di secernere β -lattamasi nella matrice del biofilm, in questo modo l'azione dell'antibiotico è contrastata su due livelli: gli enzimi secreti degradano il farmaco presente nella matrice extracellulare, mentre il biofilm stesso ne ostacola l'ingresso all'interno della cellula batterica [109].

Tale fattore risulta particolarmente importante, in quanto evidenzia la capacità dei microrganismi di determinare resistenza agli antibiotici con molteplici meccanismi, che si integrano fra loro.

1.8 Nuovi approcci terapeutici: β -lattamici ed inibitori delle β -lattamasi di nuova generazione

Lo sviluppo di AMR, ed in particolare di resistenza agli antibiotici carbapenemici, limita le opzioni terapeutiche disponibili in caso di infezione sostenuta da microrganismi resistenti. Acido clavulanico, sulbactam e tazobactam (inibitori delle β -lattamasi definiti tradizionali) non sono attivi nei confronti di microrganismi produttori di KPC. Per tale ragione, in questi casi si ricorre all'uso di polimixine e aminoglicosidi; tuttavia, il loro utilizzo è caratterizzato da una scarsa tollerabilità, infatti, è elevata l'incidenza di ototossicità, neurotossicità e nefrotossicità [111].

Al fine di ovviare a tale problema e per identificare nuove terapie utili in caso di produzione di carbapenemasi, sono stati progettati gli inibitori delle β -lattamasi di nuova generazione che hanno portato all'immissione in commercio di tre nuove terapie antibiotiche, che consistono nell'associazione di un antibiotico β -lattamico con un inibitore delle β -lattamasi: ceftazidime/avibactam (CZA), meropenem/vaborbactam (M/V) e imipenem/relebactam (I/R) (Tabella 1).

1.8.1 Ceftazidime/avibactam

Avibactam, un diazabiccioottano, è attivo contro le carbapenemasi di classe A, C e D, dunque ripristina l'attività di ceftazidime verso i batteri Gram-negativi produttori di KPC [112].

CZA è stato autorizzato dall'FDA, nel 2015 e l'anno successivo dall'EMA per il trattamento di infezioni intra-addominali, polmonite nosocomiale, polmonite associata alla ventilazione meccanica, e infezioni complicate delle vie urinarie [113].

I primi report sullo sviluppo di resistenza a CZA sono stati pubblicati in aree in cui la prevalenza di microrganismi Gram-negativi multi-resistenti e pan-resistenti è elevata (principalmente sud-est asiatico e Cina in particolare) [114]. Con il tempo, l'entità del fenomeno è aumentata, interessando tutti i continenti, con una vasta letteratura a riguardo.

1.8.2 Meropenem/vaborbactam

Il vaborbactam è dotato di attività inibitoria contro ESBL, AmpC, e carbapenemasi di classe A, mentre non è attivo nei confronti delle carbapenemasi di classe B e D [115].

Come dimostrato dagli studi clinici, la co-somministrazione di vaborbactam e meropenem è in grado di ripristinare l'attività di quest'ultimo verso i ceppi produttori di carbapenemasi di classe A [116; 117].

Tale terapia d'associazione è stata approvata dall'FDA e dall'EMA per il trattamento di infezioni complicate delle vie urinarie, infezioni intra-addominali, polmonite nosocomiale, polmonite associata alla ventilazione meccanica, infezioni sostenute da Gram-negativi le cui opzioni di trattamento siano limitate.

1.8.3 Imipenem/relebactam

Dotato di attività inibitoria verso le carbapenemasi di classe A e C, attualmente è indicato per il trattamento di infezioni complicate delle vie urinarie e infezioni intra-addominali, polmonite nosocomiale, polmonite associata alla ventilazione meccanica, infezioni sostenute da Gram-negativi le cui opzioni di trattamento siano limitate [118].

Il suo utilizzo nella pratica clinica è ancora limitato.

Tabella 1: Nuove terapie d'associazione

Antibiotico	Anno di approvazione	Indicazioni terapeutiche	Attività nei confronti di carbapenemasi
Ceftazdime/avibactam	2015 (FDA) 2016 (EMA)	cUTI, HAP, VAP, cIAI	ESBL, AmpC, KPC, OXA-48
Meropenem/vaborbactam	2017 (FDA) 2018 (EMA)	cUTI, HAP, VAP, cIAI, infezioni sostenute da Gram-negativi con opzioni di trattamento limitate	KPC
Imipenem/relebactam	2019 (FDA) 2020 (EMA)	cUTI, HAP, VAP, cIAI, infezioni sostenute da Gram-negativi con opzioni di trattamento limitate	KPC

Legenda: cUTI: infezioni complicate delle vie urinarie; HAP: polmonite nosocomiale; VAP: polmonite associata alla ventilazione meccanica; cIAI: infezioni intra-addominali.

Grazie alle loro indicazioni terapeutiche ed alla capacità inibitoria nei confronti delle β -lattamasi, ed in particolare delle carbapenemasi di classe A, l'uso di tali terapie sta diventando sempre più frequente.

Tuttavia, ciò ha determinato l'insorgenza di una pressione selettiva tale da determinare lo sviluppo di nuove varianti enzimatiche delle carbapenemasi, in grado di resistere all'azione di tali antibiotici. Questo è il caso di KPC: nel corso degli ultimi anni, anche grazie al crescente utilizzo delle metodiche di sequenziamento genomico, sono state identificate numerose varianti di KPC, principalmente sviluppatesi a partire dalle più comuni KPC-2 e KPC-3 [119; 120]. Fino al 2021, sono state registrate nel database NCBI le sequenze genomiche di 88 varianti di KPC [121].

Tali varianti enzimatiche risultano resistenti a CZA e sono dotate di diverso grado di suscettibilità ai carbapenemi, ciò è dovuto ad alcune sostituzioni amminoacidiche in corrispondenza del sito attivo dell'enzima che ostacolano l'interazione farmaco-recettore. Oltre alle varianti enzimatiche delle carbapenemasi, anche le mutazioni a carico dei geni che codificano per le pompe di efflusso giocano un importante ruolo nell'indurre resistenza a CZA, M/V, ed I/R; gli studi a riguardo sono ancora limitati, per tale ragione è fondamentale approfondire questi aspetti, al fine di fornire una visione quanto più completa possibile che permetta la correlazione tra genotipo e fenotipo riscontrato.

1.9 Whole Genome Sequencing

Fino ad ora, i principali metodi di identificazione dell'AMR si basavano su approcci fenotipici: principalmente metodi colturali, che permettono di identificare e quantificare il livello di resistenza a diversi farmaci antimicrobici sulla base della crescita delle cellule batteriche; in generale, si tratta di metodi semplici che permettono di misurare la minima concentrazione inibente di un determinato farmaco nei confronti del patogeno studiato. Tuttavia, tali metodiche presentano alcune limitazioni in quanto i saggi devono essere effettuati su colonie batteriche pure e, dunque, sono necessari dei passaggi di pretrattamento del campione che rallentano l'intero processo e spesso le metodiche non sono standardizzate; inoltre, tali metodiche non permettono di individuare nuovi meccanismi di resistenza, mai riscontrati prima.

Per ovviare a tali limiti, si possono usare le metodiche di tipo molecolare: esse permettono la rapida identificazione dei geni responsabili di antibiotico resistenza, inoltre, si tratta di metodiche facilmente adattabili in caso di identificazione di nuovi determinanti genici di resistenza. Tali metodiche comprendono:

- saggi di amplificazione;
- saggi di ibridizzazione;
- saggi immunocitochimici;
- sequenziamento.

Ciascuno dei suddetti approcci necessita l'applicazione di protocolli operativi specifici da parte di personale adeguatamente formato.

Nel contesto dell'AMR, le metodiche di sequenziamento possono essere usate per individuare i geni responsabili di AMR e, eventualmente, le mutazioni a carico di tali geni oppure per studiare l'intero genoma batterico, in quest'ultimo caso si parla appunto di WGS [123].

Per *Whole Genome Sequencing* (WGS) si intende il sequenziamento dell'intero genoma, con l'uso di tecniche che consentono di ottenere rapidamente grandi quantità di dati per singolo campione e che prendono il nome di *Next Generation Sequencing* (NGS) [122].

Con la pandemia da COVID-19, si è assistito ad un progressivo incremento dell'uso delle metodiche di sequenziamento, al fine di individuare le varianti virali responsabili della circolazione del virus a livello globale e monitorarne la diffusione.

Senza alcun dubbio, tali approcci possono rivelarsi utili anche in ambito di contrasto dell'AMR; per tale ragione, stanno emergendo programmi di sorveglianza genomica dei microrganismi responsabili di AMR [124; 125].

L'uso di WGS permette di ottenere l'intera sequenza nucleotidica che compone il genoma del microrganismo oggetto di studio. La successiva analisi bioinformatica di tali sequenze permette di ottenere informazioni approfondite su:

- identificazione del microrganismo;
- eventuali correlazioni filogenetiche fra vari ceppi;
- presenza di determinanti genici di virulenza;
- presenza di determinanti genici di antibiotico resistenza.

Tutte queste informazioni possono essere ottenute grazie ad una sola procedura di laboratorio, permettendo di ridurre i tempi di analisi necessari per effettuare i vari saggi di identificazione e suscettibilità agli antibiotici.

Tuttavia, è importante sottolineare alcuni aspetti che possono ostacolare l'uso di WGS: necessità di strumentazioni adeguate sia per il sequenziamento che per l'analisi e l'elaborazione delle sequenze ottenute, necessità di personale adeguatamente formato.

Dall'altro lato, gli indiscutibili vantaggi offerti dal WGS sono un incentivo a superare tali aspetti e agevolare l'uso di tale tecnologia. Infatti, in diverse nazioni, fra cui Stati Uniti, Regno Unito e Germania, il sequenziamento genomico dei microrganismi patogeni tramite WGS sta progressivamente diventando uno strumento di routine per il monitoraggio e l'identificazione dei ceppi multi-farmaco resistenti (MDR) e per l'identificazione degli *outbreaks* da essi determinati [32]. Le informazioni ottenute con le metodiche NGS possono rappresentare un valido strumento utile nella scelta della migliore opzione terapeutica disponibile, in caso di malattia batterica invasiva; inoltre, permettono di studiare i meccanismi genetici alla base dell'AMR e di individuare mutazioni che possono concorrere alla diffusione del fenomeno.

Le metodiche NGS includono: sequenziamento tramite sintesi (Illumina), sequenziamento ionico a semiconduttore (ThermoFisher Scientific), sequenziamento del DNA *nanoball* (Beijing Genomics Institute and MGI Tech), sequenziamento in tempo reale di una singola molecola di DNA (Pacific Biosciences), sequenziamento Nanopore (Oxford Nanopore Technologies).

Tra queste metodiche, il sequenziamento per sintesi è quella maggiormente usata. Queste ultime permettono di ottenere sequenze definite *short-reads* che, grazie a opportuni software di analisi bioinformatica, permettono di ottenere una grande quantità di informazioni in merito al corredo genetico del campione in analisi, fra cui identificazione del microrganismo, identificazione dei geni responsabili di AMR e delle loro eventuali varianti, e identificazione dei geni correlati con la virulenza. Inoltre, in caso di *outbreak*, l'uso del sequenziamento con Illumina consente di indagare e delineare la diffusione del microrganismo responsabile sia dal punto di vista spaziale, che temporale, particolarmente utile al fine di contrastarne la diffusione.

i. Scopo dello studio

L'antibiotico resistenza rappresenta una delle più importanti minacce alla salute pubblica globale, con ripercussioni sia in termini di vite umane perse, vista l'elevata mortalità associata alle infezioni sostenute da batteri MDR, che un aggravio dei costi per il sistema sanitario, legato all'aumento dei giorni di degenza e alla necessità di mettere in atto varie terapie antibiotiche.

In un mondo sempre più globalizzato come quello attuale, virus e batteri possono diffondere velocemente e con facilità; la pandemia causata da SARS-CoV-2 ne è stata un chiaro esempio, con nuove varianti virali che emergono e diffondono da un'area geografica all'altra.

Lo stesso scenario è applicabile ai batteri MDR e, per tale ragione, è essenziale mettere in atto strategie di sorveglianza attiva e monitoraggio, al fine di contenere la loro diffusione [126].

Considerando la particolare rilevanza dei batteri MDR in ambito ospedaliero, è pratica consolidata la messa in atto di programmi di screening, al fine di individuare in maniera tempestiva eventuali casi di colonizzazione e/o infezione.

Sulla base di tali premesse, l'Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari ha adottato, a partire dal 2015, il "Protocollo operativo per la sorveglianza e gestione dei pazienti con colonizzazione/infezione da *Enterobacteriaceae* CPE/CRE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae/Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*)" [127], redatto seguendo le linee guida internazionali [128]. Tale protocollo prevede l'identificazione dei casi di colonizzazione, mediante ricerca su tampone rettale dei microrganismi MDR, e la caratterizzazione dei ceppi MDR responsabili di malattia invasiva.

Tali procedure hanno lo scopo di identificare prontamente i casi di colonizzazione ed attuare le misure di contenimento previste. Inoltre, al tempo stesso, l'identificazione dei determinanti di resistenza, mediante metodiche molecolari, consente il rilevamento di nuovi cloni emergenti e l'adozione di strategie preventive mirate.

Il presente elaborato di tesi rientra all'interno dell'attività di monitoraggio e caratterizzazione dei ceppi CPE e CRE, con particolare focus sui ceppi di *Klebsiella pneumoniae* multi-farmaco resistente, isolati presso i reparti dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari ed analizzati presso il laboratorio di Epidemiologia Molecolare della stessa azienda.

A partire dal mese di settembre 2019 si è osservata l'insorgenza e la rapida diffusione di un nuovo clone di *K. pneumoniae* co-produttrice di KPC e OXA-48, novità nel contesto epidemiologico locale in cui, fino a quel momento, era preponderante la diffusione di *K. pneumoniae* produttrice della sola KPC. Per tali ragioni, gli obiettivi della ricerca sono stati quelli di:

- descrivere il quadro epidemiologico esistente, mediante un continuo monitoraggio presso tutti i reparti delle nostre strutture;
- determinare, tramite Real Time-PCR, la presenza dei principali geni responsabili della resistenza agli antibiotici β -lattamici, inclusi i carbapenemi;
- determinare, tramite Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Multi Locus Sequence Typing (MLST), eventuali correlazioni filogenetiche tra ceppi;
- individuare potenziali fattori di rischio correlati allo sviluppo di infezione;
- caratterizzare i microrganismi isolati dal punto di vista fenotipico, al fine di delineare il loro profilo di suscettibilità agli antibiotici, incluse le nuove terapie d'associazione, costituite da β -lattamico e inibitore delle β -lattamasi;
- comparare il profilo genotipico e fenotipico osservato, al fine di valutare la possibile introduzione di sistemi rapidi per i test di suscettibilità agli antibiotici e ridurre i tempi di analisi;
- analizzare il genoma batterico dei ceppi di *K. pneumoniae*, caratterizzati da un marcato profilo di resistenza, mediante sequenziamento con WGS, al fine di individuare i geni di resistenza e virulenza presenti nei ceppi e confrontarli con i genomi raccolti nei database esistenti, ciò è particolarmente utile per identificare nuove varianti e, contestualmente, valutare la diffusione dei microrganismi nel corso del tempo.

Contestualmente, è stata effettuata una valutazione dei dati riguardanti la situazione epidemiologica nei reparti di degenza dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari [129].

ii. Materiali e metodi

Al fine di valutare le caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi di *K. pneumoniae*, i campioni isolati all'interno del programma di screening CPE/CRE, nel periodo settembre 2019 – dicembre 2022, sono stati inclusi nello studio.

Le metodiche, di seguito descritte, sono state utilizzate al fine di:

- caratterizzare i ceppi produttori di carbapenemasi responsabili di colonizzazione o malattia invasiva;
- comparare il profilo genotipico con quello fenotipico, emerso tramite i test di suscettibilità agli antibiotici;
- analizzare il genoma batterico, mediante WGS, degli isolati caratterizzati da un marcato profilo di resistenza a diverse classi antibiotiche, incluse le più recenti terapie d'associazione (CZA, M/V, I/R).

3.1 Caratterizzazione dei ceppi co-produttori di KPC e OXA-48

Lo stato di colonizzazione è stato identificato in base alla presenza di microrganismi nella cute, nelle ferite, nelle mucose, in secrezioni o escrezioni, senza che essi causino segni o sintomi, come da definizione.

La sorgente d'infezione è stata determinata in accordo con i criteri espressi dal CDC/National Healthcare Network [130], secondo i quali l'infezione del torrente ematico è caratterizzata dall'isolamento di un microrganismo patogeno su una o più emocolture del paziente e la presenza di tale agente patogeno non è correlata a infezioni in altri distretti corporei; per quanto riguarda i segni e i sintomi, il paziente ne deve presentare almeno uno tra i seguenti: temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$, brividi, o ipotensione. Si definisce polmonite associata alla ventilazione meccanica la polmonite che si manifesta in pazienti che hanno un dispositivo deputato alla ventilazione inserito tramite tracheostomia o intubazione da almeno 48 ore prima dell'insorgenza dell'infezione.

I ceppi inclusi nello studio sono classificati in “Multi Drug Resistant” (MDR), “Extensively Drug Resistant” (XDR) e “Pan Drug Resistant” (PDR), in base ai criteri proposti da Magiorakas e collaboratori [131].

- MDR: microrganismo non suscettibile ad almeno un farmaco antimicrobico in tre o più classi di farmaci antimicrobici;

- XDR: microrganismo non suscettibile ad almeno un farmaco antimicrobico in tutte le classi di farmaci tranne 2;
- PDR: microrganismo non suscettibile a tutti i farmaci antimicrobici.

3.1.2 Protocollo screening CPE/CRE

Nell'ambito dell'attività routinaria di screening per la ricerca di microrganismi *alert*, presso la S. C. di Direzione Igiene e Controllo delle Infezioni Ospedaliere dell'AOU di Sassari vengono quotidianamente analizzati i tamponi rettali, prelevati da pazienti ricoverati presso le diverse strutture assistenziali aziendali, seguendo i criteri elencati nel Protocollo Operativo [127]:

Il protocollo consiste in:

- screening all'ingresso per tutti i pazienti che vengono ricoverati nei reparti considerati a rischio (terapie intensive, terapie intensive neonatali, lungodegenza, geriatria, oncologia, ematologia);
- screening sulla base della valutazione dei seguenti fattori di rischio:
 - pazienti sottoposti a terapia antibiotica con carbapenemi e/o cefalosporine nei tre mesi precedenti al ricovero;
 - pazienti portatori di *devices* a permanenza;
 - pazienti colonizzati/infetti noti;
 - pazienti conviventi con soggetti colonizzati/infetti;
 - pazienti trasferiti da altre strutture sanitarie;
 - pazienti trasferiti da reparti a rischio;
 - pazienti immunodepressi;
 - pazienti provenienti da Paesi endemici;
 - donne in gravidanza a rischio.

Una volta arrivati, i tamponi rettali vengono sottoposti alle seguenti procedure operative (Figura 5):

- semina su terreno cromogeno; incubazione over night (O/N);
- lettura delle piastre;
- identificazione biochimica delle colonie;
- identificazione dei geni codificanti per carbapenemasi.

Figura 5: procedure operative.



3.1.3 Semina su terreno cromogeno

I tamponi rettali sono stati seminati sul terreno cromogeno ChromID® CARBA SMART Agar (bioMérieux, France); esso è costituito da due terreni di coltura cromogeni, denominati CARB e OXA, distribuiti sulle due metà di un'unica piastra Petri.

Il terreno è in grado di discriminare selettivamente la resistenza dovuta a microrganismi produttori di KPC e metallo-carbapenemasi, attraverso la crescita nella metà del terreno CARB e quella legata alla produzione di carbapenemasi tipo OXA, con crescita nella metà della piastra denominata OXA.

In particolare, le colonie di *E. coli* assumono una colorazione rosa, mentre i ceppi di *K. pneumoniae* si presentano come colonie dalla caratteristica colorazione verde/blu.

Dopo incubazione O/N in termostato a 37°C, si procede alla lettura delle piastre; le colonie che presentano una morfologia tipica delle *Enterobacteriaceae* sono state prelevate e seminate su Agar MacConkey.

Le colonie cresciute dopo tale fase vengono sottoposte alle successive analisi.

3.1.4 Identificazione biochimica delle colonie

Viene effettuata con il sistema automatizzato Vitek 2-System (bioMérieux, France); esso prevede l'inoculo a densità 0.5-0.6 McFarland delle colonie dopo crescita O/N; lo strumento aspira automaticamente sottovuoto nei pozzetti della card una quantità predefinita di inoculo, la card viene poi sigillata e inserita nello scomparto di incubazione/lettura. L'identificazione avviene in base alla lettura in fluorescenza, ripetuta

ogni 15 minuti, di 43 test biochimici che rilevano l'utilizzo di fonti di carbonio, attività enzimatiche e particolari resistenze; i valori di fluorescenza sono elaborati, secondo algoritmi definiti, in profili biochimici che vengono poi confrontati ai pattern di identificazione dei vari batteri, costruiti in base ai dati rilevati in letteratura e costantemente aggiornati; il software elabora il risultato finale, che verrà espresso anche sotto forma di probabilità percentuale di corrispondenza.

3.1.5 Test di sensibilità agli antibiotici

Anch'esso è stato eseguito con Vitek 2-System (bioMérieux, France); viene allestita una sospensione batterica con densità 0.5-0.6 McFarland delle colonie dopo crescita O/N, una card specifica costituita da pozzetti appaiati contenenti antibiotici disidratati a concentrazioni note viene posizionata all'interno dello strumento. Lo strumento saggia circa 20 antibiotici con un minimo di 3 e un massimo di 6 diluizioni scelte nell'intervallo più rappresentativo per ottimizzare il rapporto tra i dati analitici ed i valori di MIC di riferimento. Tutti gli isolati che hanno mostrato essere resistenti ad imipenem e/o meropenem, in accordo con le linee guida fornite dall' European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), e i ceppi che mostravano una Concentrazione Minima Inibente (MIC) per i carbapenemi maggiore di $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ sono stati sottoposti ad ulteriori indagini.

3.1.6 RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux, France)

É un test rapido che si basa sul principio descritto da Nordmann, Pioret e Dortet [132]. Il test si basa sul rilevamento della reazione di idrolisi dei carbapenemi da parte dei batteri produttori dei carbapenemasi: in seguito all'idrolisi, il terreno si acidifica, causando un viraggio di colore dell'indicatore del pH, come riportato in figura 6.

Dopo la lisi batterica che consente l'estrazione dell'enzima, il lisato viene aggiunto ad una soluzione di rilevamento che contiene un carbapeneme (imipenem), un indicatore di viraggio del pH (rosso fenolo) e zinco, che permette la rilevazione dei ceppi produttori di metallo β -lattamasi.

In seguito al tempo di incubazione, che può essere da trenta minuti a due ore, viene eseguita la lettura del pozzetto.

Figura 6: RAPIDEC® CARBA NP



3.1.7 Estrazione del DNA batterico

Precedentemente all'amplificazione, eseguita tramite Real Time PCR, i prodotti morbosi vengono sottoposti ad estrazione del DNA. Possono essere adottate due diverse metodiche:

- trattamento termico a 98°C per 10 minuti, con aggiunta di 10 µL di controllo interno, fornito nel kit (viene rilevato dal fluoroforo Quasar 670);
- protocollo di estrazione usando il kit Ribospin® vRD Kit (GeneAll, Korea), in caso di analisi direttamente dal tampone rettale, o da altri fluidi biologici (e.g. siero, CSF).

Riportato in seguito:

Protocollo di estrazione del DNA con il kit Ribospin® vRD (GeneAll):

100 µL di campione
300 µL di buffer NVL
Vortexare per 15 secondi e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
Aggiungere 350 µL di buffer RB1 e vortexare
Trasferire 750 µL di soluzione sulla colonna e centrifugare a 13.000 rpm per 30 secondi
Eliminare il liquido dalla colonna
Aggiungere 500 µL di buffer RBW e centrifugare
Eliminare il liquido dalla colonna
Aggiungere 500 µL di buffer RNW e centrifugare
Eliminare il liquido dalla colonna
Centrifugare a tutta velocità e asciugare completamente la membrana
Posizionare la colonna in una eppendorf da 1.5 ml sterile
Aggiungere 35 µL di RNase-free water al centro della membrana
Incubare a temperatura ambiente per due minuti
Centrifugare a 13.000 rpm per un minuto
Conservare l'eluato finale, contenente il DNA estratto.

3.1.8 Real-time PCR

Al fine di individuare i geni di resistenza ai carbapenemi, le colonie isolate sono state sottoposte ad analisi molecolare mediante Real time-PCR.

In particolare, è stato utilizzato il kit commerciale Allplex™ Entero-DR Assay (Seegene, Korea) che permette di identificare simultaneamente i seguenti geni responsabili di antibiotico resistenza: *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*IMP (geni che codificano per carbapenemasi); *bla*CTX-M (gene codificante per β-lattamasi a spettro esteso, indicate con la sigla ESBL); *vanA* e *vanB* (geni responsabili per la resistenza alla vancomicina).

La tabella seguente elenca le varianti dei vari geni responsabili di antibiotico resistenza che vengono rilevate dal kit in uso:

Target	Varianti alleliche	
<i>bla</i> CTX-M	Gruppo 1	1, 3, 11, 12, 15, 22, 23, 28-30, 32-34, 36, 37, 42, 52-55, 57, 58, 60-62, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 80, 82, 88, 96, 101, 103, 107-109, 114, 116, 117, 123, 132, 136, 139, 142, 144, 155-158, 162-164, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 175-177, 179-184, 186, 188-190, 193, 194
	Gruppo 2	2, 4, 5-7, 20, 31, 35, 43, 44, 56, 59, 74-77, 92, 95, 97, 124, 131, 141, 165, 171
	Gruppo 9	9, 13, 14, 16-19, 21, 24, 27, 38-45, 51, 64, 65, 67, 81, 83-87, 90, 93, 98, 99, 102, 104-106, 110-113, 121, 122, 125, 126, 129, 130, 134, 137, 147, 148, 159, 161, 168, 174, 191, 195, 196
	Gruppo 8	8, 40, 63
	Gruppo 25	25, 26, 39, 41, 78, 89, 91, 94, 100, 152, 160, 185
<i>bla</i> KPC		2-19, 21-26, 28
<i>bla</i> OXA-48		48, 162, 163, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 252, 370, 416, 438, 439, 484, 505, 514, 515, 538

<i>blaIMP</i>		1-35, 37, 38, 40-, 45, 47-49, 51-54, 56, 58-61, 63
<i>blaVIM</i>		1-20, 23-43, 45-47, 49-51, 54
<i>blaNDM</i>		1-18

La Real time-PCR permette di aumentare l'affidabilità e specificità dei risultati ottenuti rispetto alla PCR tradizionale; tale metodica si basa sulla misura del segnale di fluorescenza che viene generato ad ogni ciclo di amplificazione; maggiore è la quantità di DNA presente nel campione da analizzare, più precoce sarà il ciclo di amplificazione nel quale il segnale di fluorescenza verrà rivelato. I fluorofori utilizzati sono i seguenti:

- Cal Red 610, per la rilevazione di *blaCTX-M* e di *blaVIM*;
- FAM per identificare *blaKPC* e di *blaNDM*;
- HEX per *blaOXA-48* e *VanA*;
- Quasar 705 per *blaIMP*;
- Quasar 670 per la rilevazione di *VanB*.

Un vantaggio significativo introdotto dalla Real-time PCR è la rapidità con la quale si ottengono i risultati (circa 1 h e 30 min), insieme alla riduzione dei tempi necessari per ogni ciclo di reazione e alla mancanza di procedure di rilevazione post-PCR.

3.1.8.1 Allestimento Real-Time PCR

Scongelare, vortexare e centrifugare brevemente i componenti del kit
Preparare la mix di reazione: mettere all'interno di una eppendorf da 1.5 ml, 5 µL dei seguenti Entero DR-MOM, EM-4, EM-Buffer, per ciascuno campione da analizzare
Vortexare e centrifugare brevemente la mix ed i campioni
Aliquotare 15 µL di mix per ciascuno campione nei pozzetti della piastra per PCR
Nei pozzetti contenenti la mix, aggiungere 5 µL di campione. In questa fase aggiungere anche 5 µL di controllo negativo e 5 µL di controllo positivo nei relativi pozzetti, ciò permette di valutare la sensibilità e la specificità della metodica e di evidenziare la presenza di falsi positivi o falsi negativi
Chiudere e centrifugare brevemente la piastra
Avviare l'analisi

Il protocollo termico è il seguente:

Step	Numero di cicli	Temperatura	Durata
1	1	95°C	15 min
2	45	95°C	10 sec
3		60°C	15 sec
4		72°C	10 sec
5		Ripetizione dallo step 2 per 44 volte	

Al termine della *run*, una rapida visualizzazione dei risultati è ottenuta grazie al software Seegene Viewer (Seegene, Korea) che elabora i dati di PCR.

Gli isolati identificati come *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi sono stati opportunamente conservati a -80° C in appositi criotubi (Microbank™, ProLab Diagnostic) per successive analisi.

3.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Multi Locus Sequence Type (MLST)

Gli isolati di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi sono stati tipizzati dal punto di vista molecolare mediante PFGE e MLST.

La PFGE è stata eseguita in accordo con quanto previsto dal CDC Pulse Net USA (The National Molecular Subtyping Network For Foodborne Disease Surveillance), che prevede l'inglobamento della sospensione batterica in dischetti di agarosio; successivamente, il DNA batterico è stato frammentato usando l'enzima di restrizione *XbaI* (Fermantas, Milano, Italia).

I frammenti sono stati separati su gel di Agarosio 1% e TBE 0.5X in un sistema CHEF DRII (Clamped Homogeneous Electric Fields, Bio-Rad Laboratories), si tratta di un sistema elettroforetico a campo pulsato che invia impulsi dai quattro poli del campo elettrico, permettendo così di ottenere una migliore separazione dei frammenti di DNA. Di seguito sono elencate le specifiche condizioni utilizzate per la corsa elettroforetica:

- *initial switch time*: 2 secondi;
- *final switch time*: 64 secondi;
- temperatura: 14°C;
- intensità di campo elettrico: 6V/cm;

- durata corsa: 22 ore.

Al termine della corsa elettroforetica, il gel è stato colorato per 15 minuti in una soluzione di bromuro di etidio (0.4 µg/ml in H₂O) e decolorato in acqua.

Le immagini sono state rilevate usando l'Image Master Program e i profili di restrizione ottenuti sono stati analizzati con il software GelCompar II v. 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Le percentuali di similarità, ottenute con il coefficiente di Dice [133], sono state elaborate dal software per produrre un dendrogramma. I risultati sono stati interpretati in accordo con le linee guida di Tenover [134]:

- gli isolati vengono considerati geneticamente identici se hanno lo stesso numero di bande nei pattern di restrizione e tali bande sono tutte della stessa grandezza;
- gli isolati che sono strettamente correlati fra loro hanno due o tre bande differenti, ciò è dovuto ad un singolo evento genico (mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni);
- gli isolati probabilmente correlati hanno da quattro a sei bande di differenza, dovute a due eventi genici indipendenti;
- isolati che non sono geneticamente correlati fra loro hanno sette o più bande differenti, dovute a tre o più eventi genici indipendenti.

Al fine di attribuire uno specifico *Sequence Type* ai ceppi in analisi, i microrganismi sono stati sottoposti a MLST, facendo riferimento al protocollo dell'Istituto Pasteur, centro di riferimento dell'ECDC.

Il protocollo prevede una reazione di amplificazione e la successiva analisi di sequenza di frammenti interni di sette geni *housekeeping*:

- *rpoB* (beta-subunit of RNA polymerase);
- *gapA* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase);
- *mdh* (malate dehydrogenase);
- *pgi* (phosphoglucose isomerase);
- *phoE* (phosphorine E);
- *infB* (translation initiation factor 2);
- *tonB* (periplasmic energy transducer).

I primers utilizzati per la reazione di amplificazione sono stati i seguenti:

Forward/Reverse	Sequenza Primers
rpoB : F : Vic3 :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATG
oF :	GCWGAGAACCA

rpoB : R : Vic2 : oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAA GTTGTAACC
gapA : F : 173 : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATG ACTCACTCACGG
gapA : R : 181 : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTTCAGAAGCG GCTTGATGGCTT
mdh : F : 130 : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCG CTTCAGGTTTCAG
mdh : R : 867 : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCC CAGCAGCAG
pgi : F : 1R : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAAC CTGCTGTACTGCTGGC
pgi : R : 1F : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCT TTATAGCGGTTAAT
phoE : F : 604.1 : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGC AACACCGACTTCTTCGG
phoE : R : 604.2 : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACT GGTAGGTGAT
infB : 1F : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCT GGACTATATTCG
infB : 1R : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCT CAAGAACTTC
tonB : 1F : oF :	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCT CGGTACATCAGGTT
tonB : 2R : oR :	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCT GRGCGAGAG

Le condizioni operative sono descritte in seguito:

Mix di reazione	Cicli di amplificazione
PCR Hot MasterMix 10 µl	94°C per 2 min 94°C per 30 s 50°C per 30 s 72°C per 30 s 72°C per 5 min <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> } 35 cicli </div>
MgCl (25 mM) 1,2 µl	
Primer F (10 mM) 0,75 µl	
Primer R (10 mM) 0,75 µl	
H ₂ O 11,3 µl	
Campione 1 µl	

Si è poi proceduto al sequenziamento di entrambe i filamenti, usando i primers già utilizzati per la reazione di amplificazione e, successivamente, è stato identificato il Sequence Type, usando il programma Bioedit.

Una volta effettuato il sequenziamento, le sequenze sono state inserite nel sito dell'Istituto Pasteur per valutare la "percentuale di identità" e la compatibilità delle sequenze alleliche ottenute, confrontate con quelle depositate nella banca dati dell'Istituto Pasteur.

3.3 Comparazione profilo genotipico e fenotipico degli isolati di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi

Tra i campioni isolati nel periodo 2019-2022, sono stati selezionati 109 ceppi di *K. pneumoniae* così ripartiti: 32 produttori di KPC, 34 produttori di KPC ed OXA-48, 31 produttori di KPC e CTX-M e 12 non produttori di carbapenemasi; al fine di determinare la MIC dei principali antibiotici, essi sono stati analizzati con AST ed ETEST, quest'ultimo metodo è stato utilizzato per la determinazione della MIC delle più recenti terapie d'associazione disponibili: ceftazidime/avibactam (CZA), meropenem/vaborbactam (M/V), imipenem/relebactam (I/R).

3.3.1 ETest®

Per gli isolati di *K. pneumoniae* selezionati è stata misurata la MIC per ceftazidime/avibactam (CZA), meropenem/vaborbactam (M/V), imipenem/relebactam (I/R), tre terapie antibiotiche di recente immissione in commercio, usando gli ETest® (bioMérieux, France).

Si tratta di strisce reattive contenenti 15 concentrazioni diverse di farmaco; dunque, permettono di determinare la MIC in base al gradiente di concentrazione.

I ceppi sono stati seminati su TSA Agar (bioMérieux), dopo incubazione O/N in termostato a 37°C, è stata preparata la sospensione batterica a 0.5-0.6 McFarland; la sospensione è stata seminata su Mueller Hinton Agar (bioMérieux), usando un tampone sterile e, successivamente, la strip è stata posizionata al centro della piastra.

Dopo incubazione O/N a 37°C per 16-20 ore, si è proceduto alla lettura dei valori di MIC ottenuti: il punto di intersezione tra strip e alone di inibizione indica la MIC. I risultati sono stati interpretati in accordo con i criteri EUCAST [135].

3.3.2 Calcolo dell'Antimicrobial Resistance Index

Al fine di determinare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo, l'Antimicrobial Resistance Index (ARI) è stato calcolato come indicato da De Socio e collaboratori [136]. Per ciascun antibiotico testato, è stato assegnato un punteggio pari a 0 in caso di suscettibilità, 0,5 in caso di resistenza intermedia, 1 in caso di resistenza; successivamente, la somma ottenuta per ciascun ceppo è stata divisa per il numero di antibiotici testati, al fine di ottenere valori compresi tra 0 e 1.

3.4 Sequenziamento dei ceppi tramite Whole Genome Sequencing

I ceppi (17) che sono risultati resistenti a CZA, M/V e I/R sono stati sequenziati con metodica WGS, usando la piattaforma Illumina Nova Seq 6000.

Il gDNA è stato estratto usando il Kit di estrazione QIAmp®DNA Mini Kit (Qiagen, Germany).

Di seguito è riportato il protocollo operativo:

Pipettare 20 µl di proteinasi K in una eppendorf da 1,5 ml
Aggiungere 200 µl di campione
Aggiungere 200 µl di Buffer AL
Vortexare per 15 sec

Incubare a 56°C per 10 min
Centrifugare velocemente per rimuovere le goccioline dal tappo
Aggiungere 200 µl di etanolo 96% v/v al campione e vortexare per 15 sec.
Centrifugare brevemente
Trasferire il contenuto della eppendorf in una colonnina Qiagen da 2 ml, centrifugare a 8000 rpm per 1 min. Eliminare il tubino e sostituirlo con uno nuovo
Aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare a 8000 rpm per 1 min. Eliminare il tubino e sostituirlo con uno nuovo
Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 14000 rpm per 3 min. Eliminare il tubino
Mettere la colonnina in una eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 200 µl di Buffer AE.
Incubare a temperatura ambiente per 1 min
Centrifugare a 8000 rpm per 1 min
Eliminare la colonnina e conservare l'eluato.

Dopo la fase di estrazione, la concentrazione di gDNA in ciascun campione è stata misurata con NanoDrop (Thermo Fisher).

I campioni, conservati in eppendorf a -80°C, sono stati sequenziati presso la Novogene Co. (UK) con Illumina Nova Seq 6000; per ogni campione analizzato è stato generato un report con le caratteristiche di sequenziamento del ceppo.

3.4.1 Analisi bioinformatica

Successivamente, le *raw reads* ottenute sono state sottoposte ad analisi bioinformatica.

Il *trimming* degli adattatori è stato eseguito con Fastp (v0.20.1) [137], successivamente, al fine di valutarne la qualità dopo la rimozione degli adattatori, le *raw reads* sono state analizzate con FastQC (v0.11.9) [138].

Il software SPAdes Genome Assembler (v3.14.1) [139] è stato utilizzato per effettuare l'assemblaggio de novo delle sequenze ottenute, inserendo l'opzione '-careful' nella linea di comando. La qualità degli *assemblies* ottenuti è stata valutata con Quast (v5.1) [140]. Prokka e mlst tool (v2.11) sono stati utilizzati per effettuare l'annotazione del genoma e per determinare il Sequence Type, rispettivamente [141; 142].

La determinazione del fenotipo capsulare (K) è stata effettuata usando Kaptive (v0.7.3) [143; 144].

Kleborate (v2.2.0) è stato usato per determinare la presenza di determinanti genici di antibiotico resistenza e di fattori di virulenza [145].

MobileElementFinder tool (v1.0.3) [146] e PlasmidFinder (v2.0.1) [147] sono stati usati per la determinazione degli elementi genici mobili e per l'identificazione dei plasmidi, rispettivamente.

La presenza del trasposone Tn4401 è stata determinata usando il software TETyper (v1.1) [148].

L'analisi del *core genome* è stata effettuata con il software Roary (v3.13.0) [149], kSNP3 (v3.1.2) [150] è stato usato per indagare i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs).

Sulle sequenze genomiche ottenute è stata condotta un'analisi filogenetica, usando il software IQTREE (v2.0.6) [151], che si basa sul metodo statistico della massima verosimiglianza (Maximum Likelihood method). Al fine di ricostruire potenziali catene di trasmissione dei ceppi studiati, il software BEAST (v1.10.4) è stato usato per creare un albero Bayesiano [152]. Sono state eseguite tre *runs* indipendenti usando tale software, i dati di output ottenuti sono stati combinati tra loro e analizzati usando Tracer (v1.7.1) [153]. iTOL (v5) è stato adoperato per la visualizzazione dell'albero filogenetico ottenuto [154].

3.5 Analisi statistica

Le seguenti variabili sono state raccolte e inserite in un foglio elettronico: demografiche (sesso, età), cliniche (durata del ricovero, reparto di degenza, device, comorbidità, esito del ricovero), e microbiologiche (insorgenza di malattia batterica invasiva, esito delle analisi fenotipiche e genotipiche).

Le frequenze assolute e relative, la media e la deviazione standard (SD), o la mediana e il range interquartile (IQR) sono stati usati per descrivere le variabili qualitative e quantitative, rispettivamente. Il test Shapiro-Wilk è stato utilizzato per stabilire la normalità dei dati; il test Kruskal-Wallis è stato usato per confrontare le variabili quantitative.

I valori di *p-value* <0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

I dati sono stati analizzati usando STATA Versione 17 (StataCorp, College Station, TX, USA).

4. Risultati

4.1 Evoluzione del quadro epidemiologico

La raccolta e l'elaborazione dei dati riguardanti lo Screening CPE durante il periodo di osservazione (settembre 2019-dicembre 2020) ha permesso di delineare il quadro epidemiologico esistente nei reparti della struttura ospedaliera di Sassari.

In totale, i tamponi analizzati durante il periodo di osservazione sono stati 16907, con un tasso di positività del 2.1%. Il 63% (222/349) degli isolati erano ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC mentre il 37% (127/349) erano co-produttori di KPC e OXA-48. La diffusione dei ceppi co-produttori di carbapenemasi di classe A e D è divenuta sovrapponibile a quella dei ceppi produttori della sola KPC verso la fine del periodo d'osservazione (Figura 7).

I reparti di Terapia Intensiva e Chirurgia sono stati quelli con la più ampia diffusione di *K. pneumoniae* co-produttrice di carbapenemasi di classe A e D (Figura 8).

Figura 7: Andamento temporale della diffusione di KPC vs KPC/OXA-48.

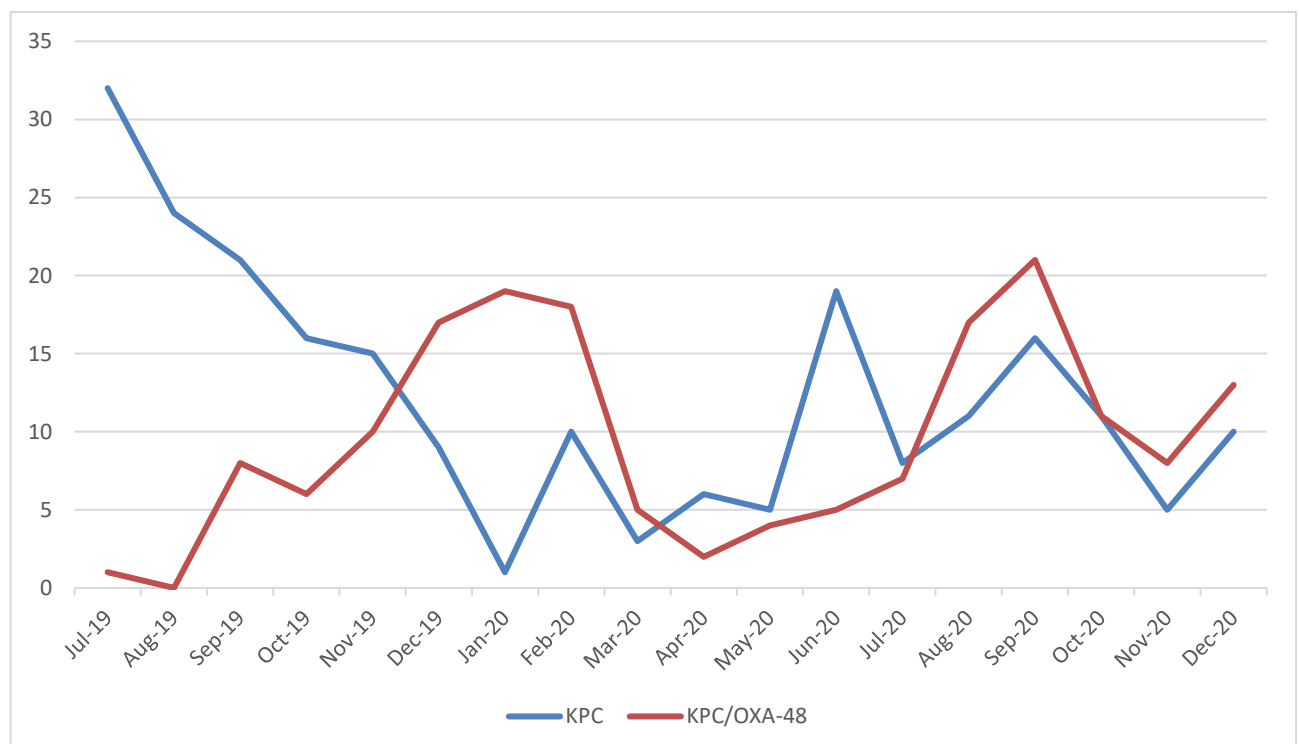
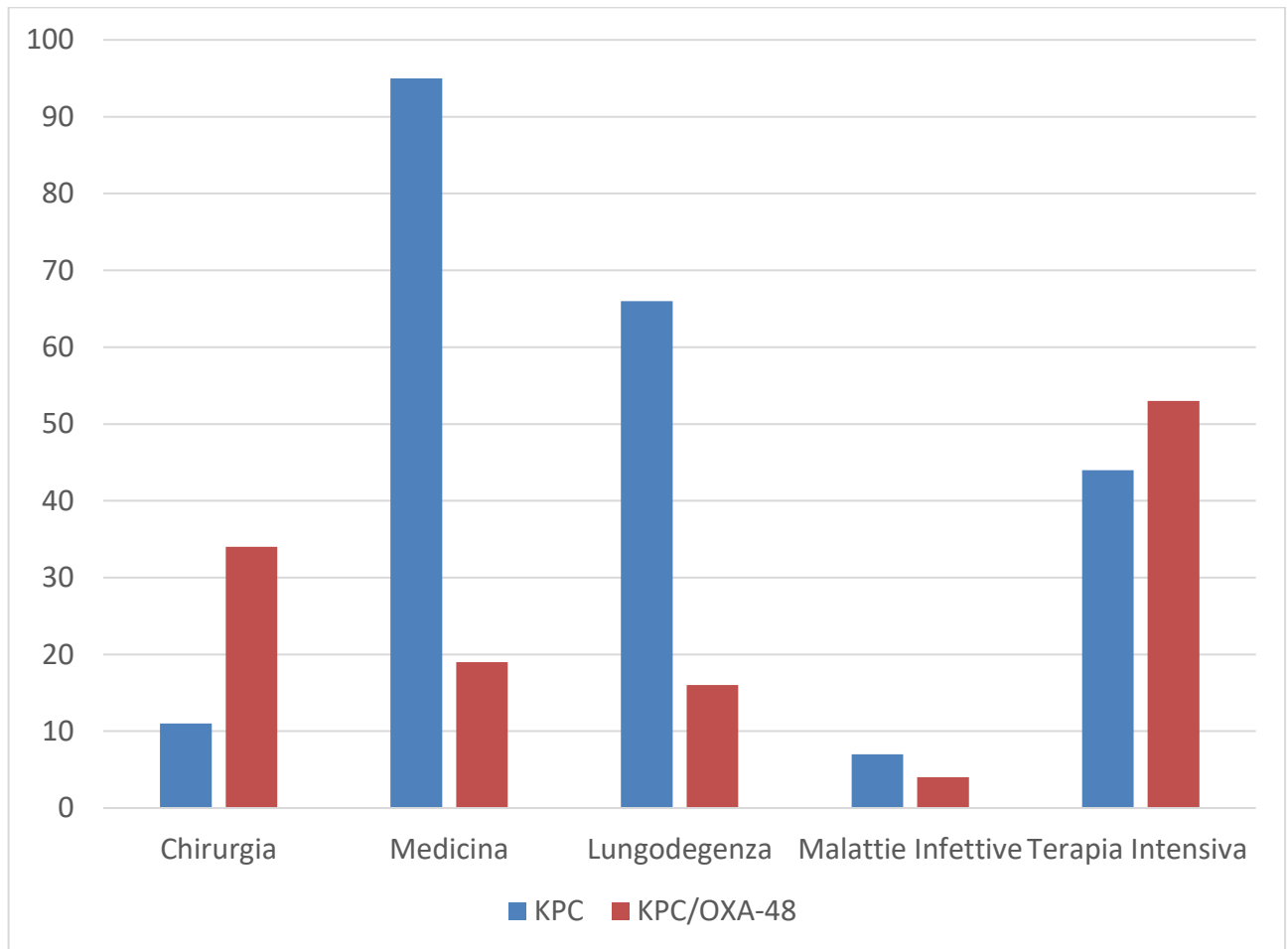


Figura 8: KPC vs KPC/OXA-48, diffusione per reparto.



4.2 Individuazione dei fattori di rischio

In totale, i ceppi di *K. pneumoniae* co-produttori di KPC e OXA-48 isolati durante il periodo di osservazione (Settembre 2019-Dicembre 2020) sono stati 127; essi sono stati isolati da altrettanti pazienti.

L'età media dei pazienti era 70 (61-77) anni, 53 (41.7%) pazienti erano donne.

Tabella 2: caratteristiche demografiche dei pazienti oggetto dello studio (n=127)

Caratteristiche demografiche		
Donne, <i>n</i> (%)		53 (41.7)
Età media (IQR)		70 (61-77)
Reparto, <i>n</i> (%)	Chirurgia	38 (29.9)
	Terapia Intensiva	51 (40.2)
	Medicina interna	31 (24.4)

	Malattie Infettive	3 (2.4)
	Lungodegenza	4 (3.2)
Durata media del ricovero (IQR), giorni	46 (29-68)	
Uso di <i>Devices</i> , <i>n</i> (%)	103 (81.1)	
Numero medio (IQR) di <i>devices</i> utilizzati per paziente	2 (1-3)	
Tipo di <i>device</i> , <i>n</i> (%)	CVC	68 (66.0)
	Catetere venoso periferico	4 (3.9)
	Catetere urinario	7 (6.8)
	PEG	9 (8.7)
	Catetere arterioso	37 (35.9)
	VMC	51 (49.5)
	Tubo tracheale	31 (30.1)
	Altre stomie	15 (14.5)
Tempo medio (in giorni, IQR) tra ricovero e colonizzazione	26 (13-43)	
Pazienti con comorbidità, <i>n</i> (%)	86 (66.1)	
Malattia batterica invasiva, <i>n</i> (%)	Batteriemia	14/31 (45.2)
	Infezione del tratto respiratorio	17/31 (54.8)
Tempo medio (in giorni, IQR) tra diagnosi di colonizzazione e sviluppo di malattia batterica invasiva	10 (0-22)	
Decessi, <i>n</i> (%)	42 (33.1)	

Legenda: CVC, catetere venoso centrale; PEG, gastrostomia endoscopica percutanea; VMC, ventilazione meccanica controllata.

I principali reparti di ricovero dei pazienti inclusi nello studio sono stati: terapia intensiva (51/127; 40.1%), chirurgia (38/127; 29.9%), medicina interna (31/127; 24.4%), lungodegenza (4/127; 3.2%), e reparto di malattie infettive (3/127; 2.4%).

La durata media di ricovero è stata di 46 (29-68) giorni.

I pazienti con almeno un *device* erano l'80% (103/127; 81.1%) del totale; di seguito, sono elencati i principali *devices* utilizzati: catetere venoso centrale (68/127; 66.0%), device per la ventilazione meccanica controllata (51/127; 49.5%), catetere arterioso (37/127;

35.9%), tubo tracheale (31/127; 30.1%). In media, ciascun paziente presentava almeno due *devices*.

Per quanto riguarda il tempo che è intercorso tra ricovero e identificazione della colonizzazione da *K. pneumoniae* co-produttrice di KPC ed OXA-48 è stato di 26 giorni (con un range compreso tra 13 e 43 giorni).

Più della metà dei pazienti avevano una comorbidità (84/127; 66.1%), nello specifico: ipertensione (44.1%), cancro (26.2%), diabete (25.0%), cardiomiopatia (23.8%).

Una fetta importante di pazienti con comorbidità (63/84; 75%) ne presentava due o più, come descritto in tabella 3.

Tabella 3: comorbidità riscontrate

Comorbidità	Coorte totale n (%) (84; 100%)	Una comorbidità (21/84; 25%)	≥2 comorbidità (63/84; 75%)
Ipertensione	37 (44.1)	2 (9.5)	35 (55.6)
Cancro	22 (26.2)	9 (42.9)	13 (20.6)
Diabete	21 (25.0)	2 (9.5)	19 (30.2)
Cardiomiopatia	20 (23.8)	1 (4.8)	19 (30.2)
Fibrillazione atriale	14 (16.7)	0 (0.0)	14 (22.2)
Anemia	14 (16.7)	2 (9.5)	12 (19.1)
Obesità	13 (15.5)	0 (0.0)	13 (20.6)
COPD	12 (14.3)	0 (0.0)	12 (19.1)
Insufficienza renale cronica	12 (14.3)	1 (4.8)	11 (17.5)
Insufficienza respiratoria	10 (11.9)	1 (4.8)	9 (14.3)
Iperplasia prostatica benigna	7 (8.3)	1 (4.8)	6 (9.5)
Asma	4 (4.8)	1 (4.8)	3 (4.8)
Patologie autoimmuni	4 (4.8)	0 (0.0)	4 (6.4)
Artrite reumatoide	3 (3.6)	0 (0.0)	3 (4.8)
Sclerosi multipla	3 (3.6)	1 (4.8)	2 (3.2)
Leucemia/mieloma	2 (2.4)	0 (0.0)	2 (3.2)

Legenda: COPD, broncopneumopatia cronica ostruttiva.

I casi di malattia batterica invasiva dovuti a *K. pneumoniae* KPC e OXA-48 riscontrati durante il periodo di osservazione sono stati 31/127 (24.4%); nello specifico, ci sono stati 17 casi di infezioni del tratto respiratorio (17/31; 54.8%) e 14 casi di batteriemia (14/31; 45.2%). In media, il tempo intercorso tra la diagnosi di colonizzazione e quella di infezione è stato di 10 (0-22) giorni.

I decessi sono stati 42 (33.1%). Le analisi statistiche effettuate (tabella 4) hanno permesso di rilevare che il ricovero presso i reparti di terapia intensiva era associato ad un elevato rischio di mortalità (OR: 5.39, 95% CI: 2.42–12.00; *p-value* ≤ 0.001) e ad un aumentato rischio di sviluppare malattia batterica invasiva (OR 6.12, 95% CI: 2.55–14.69; *p-value* < 0.001).

Tabella 4: analisi di regressione logistica per la valutazione delle correlazioni tra caratteristiche demografiche, epidemiologiche e cliniche e mortalità.

Variabili		OR (95% CI)	<i>p-value</i>
Donne, <i>n</i> (%)		0.80 (0.38–1.70)	0.56
Età media (IQR)		1.03 (1.00–1.06)	0.07
Reparto di ricovero	Chirurgia	0.16 (0.05–0.48)	0.001
	Terapia intensiva	5.39 (2.42–12.00)	<0.001
	Medicina	0.78 (0.32–1.89)	0.58
	Malattie infettive	/	/
	Lungodegenza	0.67 (0.07–6.61)	0.73
Durata media (IQR) del ricovero		1.01 (1.00–1.01)	0.24
Uso di <i>devices</i>		2.13 (0.73–6.17)	0.16
Numero di <i>devices</i>		1.13 (0.72–1.78)	0.60
Intervallo medio (IQR) di giorni tra ricovero e colonizzazione		1.00 (0.99–1.02)	0.64
Pazienti con comorbidità, <i>n</i>		0.88 (0.41–1.92)	0.76
Comorbidità	Iperensione	1.28 (0.51–3.20)	0.60
	Cardiomiopatia	0.64 (0.20–1.98)	0.44
	Diabete	1.88 (0.67–5.21)	0.23
	COPD	1.07 (0.29–3.90)	0.92
	Obesità	0.93 (0.26–3.33)	0.91
	Asma	/	/

	Cancro	0.98 (0.35–2.78)	0.97
	Insufficienza respiratoria	/	/
	Sclerosi multipla	/	/
Intervallo medio (IQR) di giorni tra colonizzazione e sviluppo di malattia batterica invasiva		0.99 (0.98–1.01)	0.35
Malattia batterica invasiva		6.12 (2.55–14.69)	<0.001

Inoltre, il rischio di sviluppare una malattia batterica invasiva risultava maggiore nei pazienti diabetici e in quelli ricoverati in terapia intensiva, come evidenziato dalle analisi di regressione logistica effettuate (tabella 5), con OR: 3.26, 95% CI: 1.08–9.90; *p-value*: 0.04 e OR: 3.81, 95% CI: 1.63–8.93; *p-value*: 0.002, rispettivamente.

Tabella 5: analisi di regressione logistica per la valutazione delle correlazioni tra caratteristiche demografiche, epidemiologiche e cliniche e sviluppo di malattia batterica invasiva.

Variabili		OR (95% CI)	<i>p-value</i>
Donne, <i>n</i> (%)		0.48 (0.20–1.16)	0.10
Età media (IQR)		0.98 (0.96–1.01)	0.22
Reparto di ricovero	Chirurgia	0.27 (0.09–0.84)	0.02
	Terapia intensiva	3.81 (1.63–8.93)	0.002
	Medicina interna	0.88 (0.34–2.29)	0.79
	Malattie infettive	/	/
	Lungodegenza	/	/
Durata media (IQR) del ricovero		1.01 (1.00–1.02)	0.05
Uso di <i>devices</i>		4.31 (0.95–19.51)	0.06
Numero di <i>devices</i>		1.41 (0.89–2.31)	0.18
Intervallo medio (IQR) di giorni tra ricovero e colonizzazione		1.00 (0.99–1.01)	0.93
Pazienti con comorbidità, <i>n</i>		0.63 (0.27–1.45)	0.28
Comorbidità	Ipertensione	1.81 (0.63–5.17)	0.27
	Cardiomiopatia	0.58 (0.15–2.23)	0.43
	Diabete	3.26 (1.08–9.90)	0.04

	COPD	0.70 (0.14–3.53)	0.67
	Obesità	1.12 (0.27–4.59)	0.88
	Asma	/	/
	Cancro	0.76 (0.22–2.62)	0.67
	Insufficienza respiratoria	/	/
	Sclerosi multipla	/	/

Per il 54.3% (69/127) dei ceppi inclusi nello studio, è stato possibile eseguire l'antibiogramma, con il sistema VITEK II.

I dati, riportati in tabella 6, mostrano un complesso profilo di resistenza alla maggior parte delle categorie di antibiotici testati, inclusi carbapenemi, cefalosporine, penicilline e aminoglicosidi. Infatti, tutti i ceppi risultano resistenti all'imipenem e all'ertapenem, il 99% sono resistenti al meropenem, nessuno dei ceppi batterici testati ha mostrato suscettibilità verso amikacina, amoxicillina/acido clavulanico, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina, fosfomicina, gentamicina, piperacillina/tazobactam, trimetoprim/sulfametossazolo, ceftolozane/tazobactam, tobramicina, la resistenza alla tigeciclina è stata riscontrata nell'88% dei ceppi testati mentre il 29% dei ceppi sono risultati resistenti a ceftazidime/avibactam.

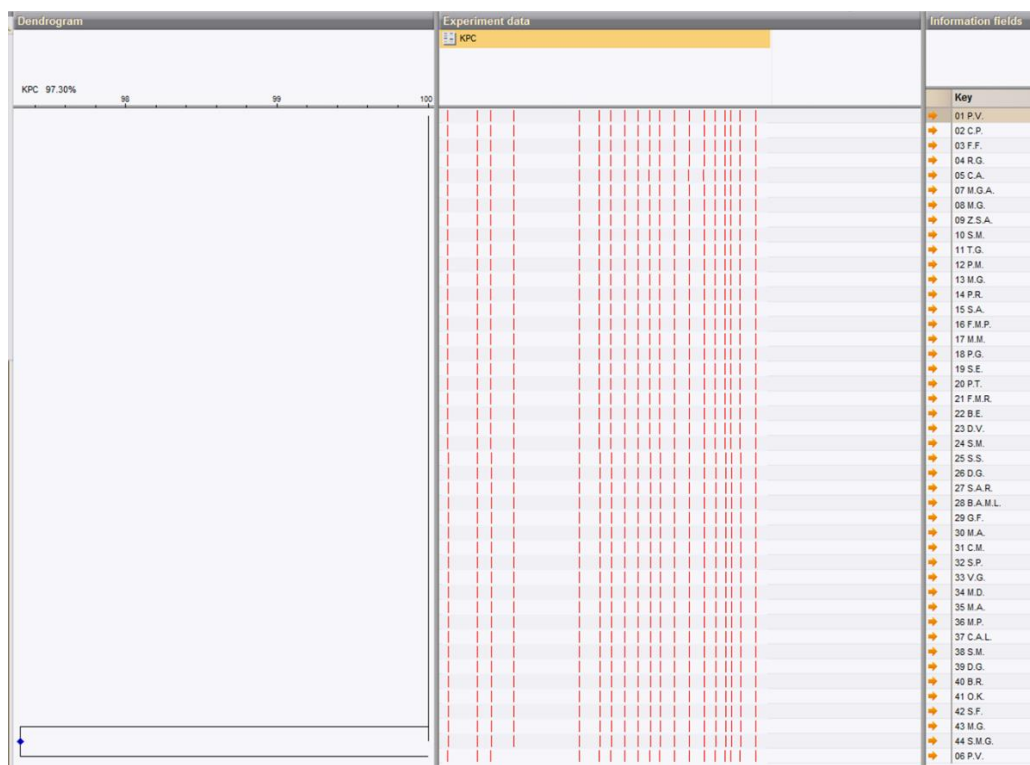
Tabella 6: Risultati degli antibiogrammi eseguiti

Antibiotico	N ceppi con resistenza intermedia (%)	N ceppi resistenti (%)
Amikacina	-	69/69 (100)
Amoxicillina/acido clavulanico	-	69/69 (100)
Cefepime	-	38/38 (100)
Cefotaxime	-	69/69 (100)
Ceftazidime	-	69/69 (100)
Ciprofloxacina	-	69/69 (100)
Ertapenem	-	48/48 (100)
Fosfomicina	-	36/36 (100)
Gentamicina	-	65/69 (94)
Imipenem	-	25/25 (100)

Meropenem	1/69 (1)	68/69 (99)
Piperacillina/tazobactam	-	67/67 (100)
Tigeciclina	4/32 (12.5)	28/32 (88)
Trimetoprim/sulfametossazolo	-	67/67 (100)
Ceftazidime/avibactam	-	6/21 (29)
Ceftolozane/Tazobactam	-	21/21 (100)
Tobramicina	-	23/23 (100)

Fra i ceppi inclusi nello studio, ne sono stati selezionati 44 da analizzare con PFGE; tutti i ceppi analizzati presentavano lo stesso profilo di restrizione ed erano correlati filogeneticamente (coefficiente di Dice >80%; coefficiente di similarità >97%; Figura 9). L'MLST condotta sui ceppi ha permesso di evidenziare la loro appartenenza al Sequence Type (ST) 512; per tutti i ceppi è stata identificata la presenza di KPC-3.

Figura 9: dendrogramma dei 44 ceppi analizzati con PFGE



4.3 Comparazione del profilo genotipico e fenotipico degli isolati di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi

Al fine di indagare la presenza di pattern di resistenza diversi in relazione a profili genotipici diversi in *K. pneumoniae* sono stati selezionati 109 ceppi.

La selezione è stata eseguita tenendo conto di due criteri: periodo di isolamento (da dicembre 2017 a gennaio 2022) e materiale biologico in cui è stato identificato il microrganismo (tampone rettale, broncoaspirato o emocoltura); nello specifico: il 35% dei ceppi è stato isolato su tampone rettale, il 37% da emocoltura ed il restante 28% da broncoaspirato.

In base al profilo genotipico riscontrato, i ceppi sono stati divisi in quattro gruppi (tabella 7):

- No Cp, ceppi non produttori di carbapenemasi;
- KPC, ceppi produttori della sola carbapenemasi di classe A;
- KPC/CTX-M, ceppi co-produttori della carbapenemasi di classe A e di ESBL;
- KPC/OXA-48, ceppi co-produttori di carbapenemasi di classe A e D.

Tabella 7: caratteristiche dei ceppi

Variabili		Campioni (n=109)
Gruppi, n (%)	No CP	12 (11.0)
	KPC	32 (29.4)
	KPC/CTX-M	31 (28.4)
	KPC/OXA-48	34 (31.2)

I test di suscettibilità agli antibiotici eseguiti, hanno permesso di identificare un complesso pattern di antibiotico resistenza fra i ceppi produttori di carbapenemasi: la maggior parte dei ceppi sono risultati resistenti ad amoxicillina/acido clavulanico, piperacillina/tazobactam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftolozane/tazobactam, meropenem, imipenem, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametossazolo, mentre il tasso più basso di resistenza è stato riscontrato per l'amikacina, per cui il 60.4% dei ceppi sono risultati resistenti. Considerando le terapie d'associazione di nuova immissione in commercio, sono stati riscontrati tassi di resistenza più bassi: il 16.5% dei ceppi erano resistenti a CZA, il 25.7% e 22.9% a I/R e M/V, rispettivamente (Tabella 8; Tabella 9).

Inoltre, valori mediani di MIC per CZA, I/R e M/V sono stati confrontati fra i 4 gruppi in analisi: il gruppo No CP ha evidenziato i valori più bassi, mentre i ceppi appartenenti al gruppo KPC/OXA-48 avevano i più elevati valori di MIC (Tabella 10).

Tabella 8: profilo di suscettibilità agli antibiotici

Antibiotico		Campioni (n=109)
<i>Amoxicillina/acido clavulanico, n (%)</i>		102 (93.6)
<i>Piperacillina/tazobactam, n (%)</i>		99 (90.8)
<i>Cefepime, n (%)</i>		98 (89.9)
<i>Cafotaxime, n (%)</i>		99 (90.8)
<i>Ceftazidime, n (%)</i>		97 (89.0)
<i>Ceftolozane/tazobactam, n (%)</i>		97 (89.0)
<i>Meropenem, n (%)</i>	<i>Resistenti</i>	95 (87.2)
	<i>Intermedi</i>	1 (0.9)
<i>Imipenem, n (%)</i>		93 (85.3)
<i>Amikacina, n (%)</i>		66 (60.6)
<i>Gentamicina, n (%)</i>		68 (62.4)
<i>Tobramicina, n (%)</i>		90 (82.6)
<i>Ciprofloxacina, n (%)</i>	<i>Resistenti</i>	92 (84.4)
	<i>Intermedi</i>	2 (1.8)
<i>Trimetoprim/sulfametossazolo, n (%)</i>	<i>Resistenti</i>	85 (78.0)
	<i>Intermedi</i>	1 (0.9)
<i>Ceftazidime/avibactam, n (%)</i>	<i>Resistenti</i>	18 (16.5)
	<i>Intermedi</i>	1 (0.9)
<i>Imipenem/relebactam, n (%)</i>		28 (25.7)
<i>Meropenem/vaborbactam, n (%)</i>		25 (22.9)

Tabella 9: mediana (IQR) dei valori di MIC

<i>Mediana (IQR) MIC Ceftazidime/avibactam</i>	2 (1-4)
--	---------

<i>Mediana (IQR) MIC Imipenem/relebactam</i>	0.19 (0.13-3.00)
<i>Mediana (IQR) MIC Meropenem/vaborbactam</i>	0.13 (0.03-6.00)

Tabella 10: valori mediani di MIC nei gruppi di campioni

Variabili	No CP (n=12)	KPC (n=32)	KPC/CTX- M (n=31)	KPC/OXA- 48 (n=34)	p-value
<i>Mediana (IQR) MIC Ceftazidime/avibactam</i>	0.10 (0.08- 0.22)	1.75 (1.0- 2.0)	2 (1-3)	6 (3-256)	0.0001 ¹
<i>Mediana (IQR) MIC Imipenem/relebactam</i>	0.13 (0.13- 0.19)	0.19 (0.13- 0.25)	0.19 (0.13- 0.25)	3 (3-4)	0.0001 ²
<i>Mediana (IQR) MIC Meropenem/vaborbactam</i>	0.02 (0.02- 0.03)	0.13 (0.05- 0.29)	0.03 (0.03- 0.05)	8 (6-12)	0.0001 ³

1. No CP VS. KPC p= 0.0006; No CP VS. KPC/CTX-M p= 0.0003; No CP VS. KPC/OXA-48 p <0.0001; KPC VS. KPC/OXA-48 p<0.0001; KPC/CTX-M VS. KPC/OXA-48 p <0.0001.
2. No CP VS. KPC/OXA-48 p <0.0001; KPC VS. KPC/OXA-48 p <0.0001; KPC/CTX-M VS. KPC/OXA-48 p <0.0001.
3. No CP VS. KPC p= 0.02; No CP VS. KPC/CTX-M p <0.0001; KPC VS. KPC/CTX-M p= 0.04; KPC VS. KPC/OXA-48 p<0.0001; KPC/CTX-M VS. KPC/OXA-48 p <0.0001.

Calcolo dell'Indice di Antibiotico Resistenza (ARI)

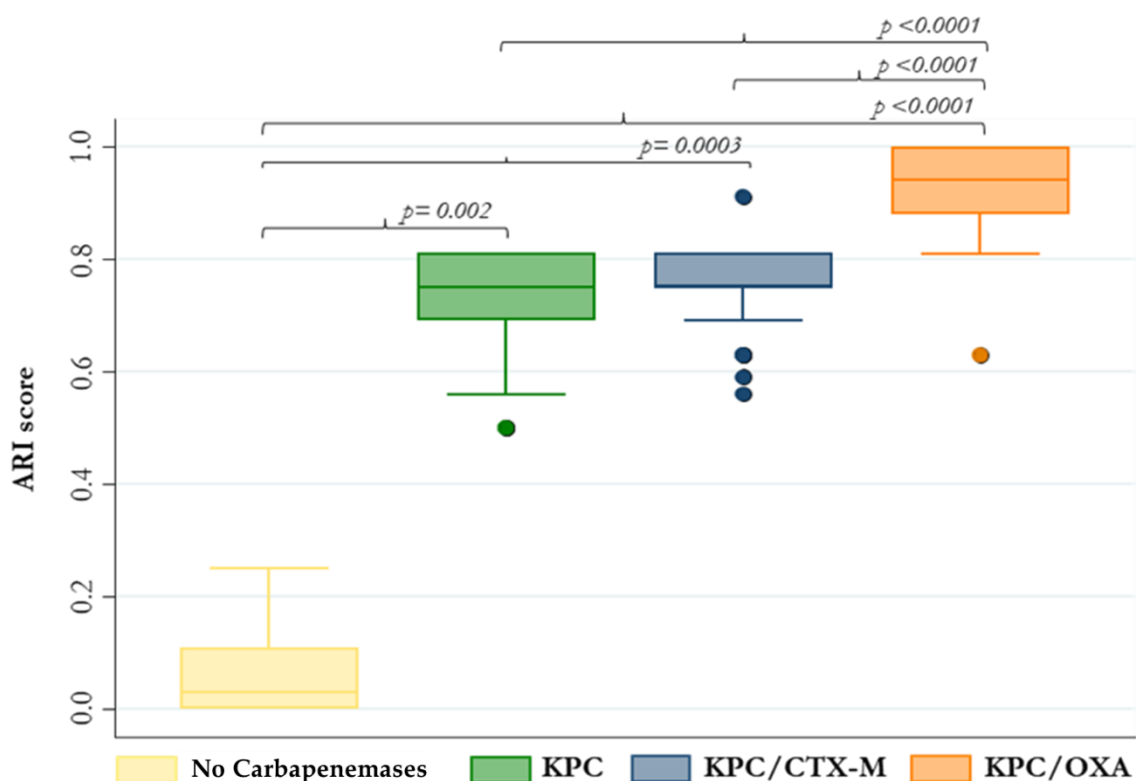
L'Indice di Antibiotico Resistenza (ARI) è stato calcolato per tutti i ceppi oggetto dello studio. La mediana (IQR) di ARI per tutti i campioni era 0.8 (0.7-0.9), con differenze significative (p=0.0001) tra i ceppi che esprimevano diverse carbapenemasi (Tabella 11). Le analisi statistiche effettuate hanno dimostrato che i valori di ARI calcolati per i campioni appartenenti al gruppo No CP erano più bassi, rispetto ai campioni appartenenti agli altri gruppi; considerando i campioni produttori di carbapenemasi, sono state individuate differenze statisticamente significative confrontando i gruppi KPC vs KPC/OXA-48 e KPC/CTX-M vs KPC/OXA-48, in entrambi i casi i valori più elevati di ARI sono stati riscontrati per i ceppi appartenenti al gruppo KPC/OXA-48, come riportato in figura 10.

Tabella 11: valori di ARI calcolati nei gruppi di campioni

Variabili	No CP (n=12)	KPC (n=32)	KPC/CTX-M (n=31)	KPC/OXA-48 (n=34)	p-value
Mediana (IQR)	0.03 (0.00-0.11)	0.75 (0.69-0.81)	0.75 (0.75-0.81)	0.94 (0.88-1.00)	0.0001 ¹

1. No CP VS. KPC p= 0.002; No CP VS. KPC/CTX-M p= 0.0003; No CP VS. KPC/OXA-48 p <0.0001; KPC VS. KPC/OXA-48 p<0.0001; KPC/CTX-M VS. KPC/OXA-48 p <0.0001.

Figura 10: Distribuzione dei valori di ARI nei vari gruppi analizzati.



Complessivamente, il 17.5% (17/97) dei ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di carbapenemasi analizzati erano caratterizzati da un profilo di antibiotico-resistenza tale da essere classificabili come ceppi pan-resistenti (PDR). Tutti i campioni dotati di tale profilo co-esprimevano i geni *blaKPC* e *blaOXA-48* (Tabella 12).

Tabella 12: ceppi PDR, informazioni generali.

N	ID campione	Carbapenemasi identificate	Data isolamento campione	Reparto	Materiale biologico
1	Kp_50	KPC, OXA-48	17/12/2020	TI 1	BRA
2	Kp_52	KPC, OXA-48	27/04/2021	Lungodegenza	TR
3	Kp_54	KPC, OXA-48	12/06/2021	TI 2	EMO
4	Kp_56	KPC, OXA-48	17/12/2020	TI 1	BRA
5	Kp_61	KPC, OXA-48	15/01/2021	TI 1	EMO
6	Kp_64	KPC, OXA-48	06/09/2021	Pneumologia	EMO
7	Kp_70	KPC, OXA-48	14/05/2021	TI 2	EMO
8	Kp_71	KPC, OXA-48	23/12/2020	TI 1	EMO
9	Kp_75	KPC, OXA-48	10/05/2021	TI 1	EMO
10	Kp_76	KPC, OXA-48	08/10/2021	Medicina d'urgenza	EMO
11	Kp_83	KPC, OXA-48	29/10/2020	TI 1	BRA
12	Kp_85	KPC, OXA-48	11/02/2021	TI 2	EMO
13	Kp_86	KPC, OXA-48	06/03/2021	Pneumologia	BRA
14	Kp_87	KPC, OXA-48	19/02/2021	TI 1	BRA
15	Kp_88	KPC, OXA-48	10/02/2021	TI 1	BRA
16	Kp_89	KPC, OXA-48	25/03/2021	TI 1	EMO
17	Kp_90	KPC, OXA-48	25/03/2021	TI 1	EMO

Legenda: TI, Terapia Intensiva; TR, tampone rettale; BRA, broncoaspirato; EMO, emocoltura.

4.4 Analisi del genoma batterico mediante Whole Genome Sequencing

L'analisi di sequenza condotta su 17 ceppi di *K. pneumoniae* resistenti a tutti gli antibiotici testati ha confermato l'appartenenza dei ceppi analizzati al *Sequence Type* (ST) 512.

Per quanto riguarda i determinanti genici di antibiotico resistenza, l'analisi condotta sul *core genome* ha rilevato la presenza di 22 geni responsabili di AMR nel 29.4% (5/17) dei ceppi, mentre nel 70.6% (12/17) dei ceppi i geni identificati sono stati 23. Questi sono in grado di conferire resistenza alle seguenti classi di farmaci antimicrobici: amminoglicosidi, fluorochinoloni, macrolidi, cloramfenicolo, rifampicina, sulfonammidi, tetracicline, trimetoprim e carbapenemi.

Considerando i geni codificanti per carbapenemasi è stata rilevata la presenza di KPC-31 nell'88.2% (15/17) dei ceppi, KPC-3 nell'11.8% (2/17) dei ceppi, TEM-1D nell'82.4% (14/17) dei ceppi, SHV-11, CMY-16, OXA-181, OXA-10 sono stati individuati nel 100% dei ceppi analizzati (Tabella 13).

Il gene *bla*KPC-31 è stato identificato nel trasposone Tn4401a, a sua volta parte del plasmide IncFIB(K); *bla*OXA-181 e *qnrS1* sono stati identificati nel plasmide colKP3 e *bla*TEM-1A è stato identificato nel trasposone Tn801, a sua volta parte del plasmide IncX3.

Inoltre, sono state individuate mutazioni a carico dei geni codificanti per le porine (*omp*); nello specifico la sequenza di OmpK35 risulta troncata ed è stata rilevata la mutazione OmpK36GD.

È stata individuata la presenza del gene *wzi154* in tutti i ceppi oggetto dello studio, mentre non è stata riscontrata la presenza di determinanti genici di virulenza.

Tabella 13: Geni responsabili di antibiotico resistenza identificati

Antibiotico	Geni di resistenza
Amminoglicosidi	aac(6')-Ib4
	aadA*
	aadA2^
	aph(3')-Ia
	strA.v1^
	strB.v1
Fluorochinoloni	qnrS1
Macrolidi	mphA
Cloramfenicolo	catA1^
	cmlA5*
	floR.v2*
Rifampicina	arr-2
Sulfamidici	sul1
	sul2
Tetracicline	Tet(A).v2
Trimetoprim	dfrA12
	dfrA14.v2*

β -lattamasi

Classe A	KPC-3
	KPC-31
	TEM-1D
	SHV-11
Classe C	CMY-16
Classe D	OXA-181

5. Discussione

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza veniva spesso definito come “*the silent pandemic*”, ovvero una pandemia silenziosa in atto da anni il cui carico non era del tutto conosciuto. Ad oggi, l'AMR ha assunto rilevanza globale e tale definizione risulta essere superata: si stima che ogni anno le infezioni sostenute da batteri MDR siano 700.000 e si prevede che potranno arrivare a 10 milioni nel 2050, se non vengono messe in atto efficaci azioni di contrasto del fenomeno [2; 7].

Nel 2015 l'WHO ha pubblicato un importante documento, il *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*, in cui vengono dichiarati i cinque obiettivi primari necessari al contrasto dell'AMR [155]:

- aumentare la consapevolezza e la conoscenza dell'AMR, sia tra il personale operante in ambito sanitario che nella popolazione generale, con programmi educativi mirati;
- promuovere la ricerca e la sorveglianza dei patogeni MDR;
- ridurre l'incidenza delle infezioni da patogeni MDR applicando le opportune misure di igiene e di prevenzione delle infezioni;
- ottimizzare l'uso dei farmaci antimicrobici nell'uomo e negli animali;
- incentivare gli investimenti nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici, di nuovi vaccini e di nuovi strumenti diagnostici.

Sulla base di quanto espresso dal WHO, appare evidente che unitamente alle azioni di *stewardship* antimicrobica e alle attività che rientrano nell'ambito della sfera *One Health*, riveste notevole importanza anche il monitoraggio del fenomeno, al fine di agevolare una rapida ed efficace identificazione dei microorganismi responsabili di AMR. In tale ambito, l'uso dei metodi di tipizzazione molecolare risulta essere un importante strumento.

La prima parte del presente lavoro di tesi descrive il quadro epidemiologico rilevato presso la struttura ospedaliera di Sassari e le caratteristiche fenotipiche e molecolari dei ceppi di *K. pneumoniae* co-produttori delle carbapenemasi KPC ed OXA-48, isolati presso i reparti di degenza durante il primo periodo di osservazione (settembre 2019-dicembre 2020). Inoltre, grazie alla raccolta dei dati riguardanti i pazienti oggetto dello studio, è stato possibile individuare i fattori di rischio correlati all'insorgenza di colonizzazione e/o infezione da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi.

Nella seconda parte dello studio, è stato approfondito il profilo di suscettibilità ai farmaci antimicrobici in un set di ceppi di *K. pneumoniae* caratterizzati da un differente profilo genotipico, al fine di individuare eventuali pattern di resistenza. Infine, si è proceduto con l'analisi delle sequenze genomiche, ottenute con WGS, dei ceppi di *K. pneumoniae* che sono risultati resistenti a tutti gli antibiotici testati. Quest'ultima parte del lavoro di tesi ha permesso di studiare a fondo il profilo genomico dei ceppi in questione.

5.1 Monitoraggio ed evoluzione del quadro epidemiologico

Il primo caso di infezione sostenuta da *K. pneumoniae* produttrice di KPC, avvenuto nella struttura ospedaliera di Sassari, è risalente al 2015. Da allora, l'attività di screening CPE/CRE è stata implementata ed ha consentito un costante monitoraggio presso tutti i reparti della struttura sanitaria. All'interno di tale programma, nel settembre 2019, è stato riscontrato il primo caso di colonizzazione da *K. pneumoniae* co-produttrice di KPC e OXA-48, in una paziente trasferita da un ospedale del nord Italia presso il reparto di terapia intensiva della struttura ospedaliera di Sassari. Questo è ritenuto il caso-indice e, ad esso hanno fatto seguito ulteriori casi sia all'interno dello stesso reparto in numerosi reparti di degenza, determinando un cambiamento del quadro epidemiologico esistente [129; 156].

Le analisi condotte al fine di indagare eventuali correlazioni filogenetiche tra i vari isolati oggetto dello studio hanno rilevato che tutti i ceppi sono risultati correlati filogeneticamente fra loro, sottolineando un'espansione di tipo monoclonale di *K. pneumoniae* co-produttrice di KPC ed OXA-48 tra i vari reparti, durante il periodo di osservazione.

Inoltre, l'analisi condotta mediante MLST ha dimostrato l'appartenenza degli isolati al ST512, facente parte del *Clonal Complex* (CC) 258, insieme a ST258, ST11, ST340. Nello specifico, ST512 è una variante del ST258, da cui differisce per una singola mutazione, dovuta ad un evento di ricombinazione genica tra ceppi appartenenti al ST11 e ceppi appartenenti al ST258 [157; 158]. I ST che fanno parte del CC258 vengono definiti "*high-risk clones*", per la loro capacità di colonizzare, diffondere e persistere in numerosi ambienti. I ceppi batterici di questo tipo sono caratterizzati da alta patogenicità e aumentata resistenza agli antibiotici, due elementi che ne agevolano la persistenza e diffusione. Infatti, grazie a tali caratteristiche, i ceppi che fanno parte del CC258 sono considerati endemici in numerose nazioni, tra cui l'Italia [159].

L'incidenza delle CPE in Italia risulta essere fra le più elevate d'Europa: nel 2021, il 26.1% dei ceppi di *K. pneumoniae* isolati sono risultati resistenti ai carbapenemi; per quanto riguarda l'espressione delle carbapenemasi, il più comune gene responsabile di antibiotico resistenza ad essere identificato a livello nazionale è stato *blaKPC* [160;161]. Le carbapenemasi di classe A, fra cui KPC, sono dotate di elevata attività idrolitica verso le cefalosporine, i monobattami e i carbapenemi [85], limitando notevolmente le opzioni terapeutiche disponibili in caso di infezioni. Inoltre, grazie alla sempre maggiore diffusione delle metodiche WGS, sono state identificate numerose varianti di KPC, alcune delle quali, caratterizzate da variazioni nella loro attività idrolitica verso i carbapenemi [162].

Per quanto riguarda le carbapenemasi appartenenti al gruppo OXA, la loro prevalenza in Italia è piuttosto bassa: infatti, si attesta allo 0.5% circa; mentre risultano endemiche nell'area dell'Africa settentrionale e in Medio Oriente [163]. L'attività idrolitica di OXA risulta maggiore verso aztreonam e cefalosporine a spettro esteso, mentre è minore verso i carbapenemi [88]. Anche per quanto riguarda le carbapenemasi OXA, l'avvento delle metodiche di sequenziamento ha permesso di indentificare numerose varianti, quelle isolate con maggior frequenza sono: OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162, OXA-244 [87].

La particolarità delle carbapenemasi è che la loro attività e, di conseguenza il profilo di resistenza agli antibiotici che determinano, è influenzata da diversi fattori: profilo idrolitico dell'enzima stesso, numero di copie del gene che codificano per l'enzima, microorganismo in cui la carbapenemasi è espressa, e presenza di ulteriori e concomitanti meccanismi di resistenza [164; 165].

Quest'ultimo aspetto riveste particolare importanza, in quanto sono diversi i report che descrivono la diffusione di ceppi batterici co-produttori di due o più carbapenemasi.

Inizialmente, il fenomeno ha interessato le zone del sud est asiatico dove le CPE sono endemiche, per poi diffondere a livello globale [166; 167]. I ceppi caratterizzati dalla co-produzione di più carbapenemasi sono spesso classificabili come MDR, in quanto presentano un complicato profilo di antibiotico resistenza e, per tale ragione, oggetto di crescente interesse in ambito scientifico [168]. Tale fenomeno è stato confermato dai risultati del nostro studio dove, rispetto ai ceppi produttori della sola KPC, la co-espressione di geni di classe A e D ha conferito un'ulteriore resistenza a tutte le classi di antibiotici.

L'insorgenza e la rapida disseminazione di ceppi MDR crea particolare preoccupazione se si considera che la maggior parte dei geni che codificano per carbapenemasi sono localizzati a livello plasmidico, dunque in grado di passare da una specie batterica all'altra e, di conseguenza, diffondere [169]. Ciò è particolarmente comune a livello nosocomiale, dove la circolazione dei batteri antibiotico resistenti è elevata e l'uso di antibiotici determina la pressione selettiva che concorre allo sviluppo di tali resistenze.

5.2 Individuazione dei fattori di rischio

Un aspetto rilevante che si è voluto approfondire è stato la determinazione dei fattori di rischio associati sia allo sviluppo di infezione nei pazienti colonizzati da cr-Kp, che ad maggiore mortalità in caso di infezione. Tali informazioni risultano cruciali, in quanto permettono di identificare i pazienti a rischio e di progettare programmi di screening mirati ed efficaci.

All'interno del nostro studio, oltre il 20% dei pazienti colonizzati ha sviluppato malattia invasiva, in accordo con quanto già descritto in letteratura. Infatti, sebbene i meccanismi che determinano la progressione dello stato di colonizzazione a quello di infezione non siano del tutto stati chiariti, è noto che la colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte di *K. pneumoniae* rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di malattia batterica invasiva [60; 63]. Inoltre, le analisi condotte hanno permesso di identificare il ricovero in terapia intensiva come un fattore di rischio per lo sviluppo di infezione nei pazienti colonizzati da cr-Kp, ciò è in linea con quanto già riportato in letteratura [170; 171]. Tale dato è ascrivibile alle procedure mediche invasive a cui i pazienti ricoverati in terapia intensiva sono spesso sottoposti e, al tempo stesso, alle terapie antibiotiche prolungate. Come noto, alcune procedure (ad esempio la ventilazione assistita), interventi chirurgici e, soprattutto, l'utilizzo di *devices*, espongono il paziente ad un rischio maggiore di contrarre infezione. Inoltre, la pressione selettiva che si può manifestare in seguito a terapia antibiotica prolungata nel tempo, come spesso accade per i pazienti ricoverati in terapia intensiva, rappresenta uno dei principali fattori che concorrono allo sviluppo di ceppi MDR.

Per quanto riguarda le comorbidità, è stato possibile rilevare un'associazione statisticamente significativa tra diabete e sviluppo di malattia batterica invasiva. Il ruolo delle comorbidità nella progressione dello stato di colonizzazione in infezione è stato oggetto di studio di numerosi lavori; si ritiene che le patologie concomitanti, alterando il

sistema immunitario dell'individuo, possano renderlo maggiormente suscettibile allo sviluppo di infezione [60].

La durata della degenza è un ulteriore fattore di rischio sia per lo sviluppo di colonizzazione che per l'insorgenza di malattia batterica invasiva, in ambito ospedaliero [64]. Il confronto della durata media della degenza, tra i pazienti che hanno sviluppato malattia batterica invasiva e quelli colonizzati, ha permesso di individuare che i giorni di degenza erano maggiori tra i pazienti appartenenti al primo gruppo (71 contro 46 giorni, rispettivamente).

La mortalità globale osservata tra i pazienti oggetto dello studio è stata del 33.1%. Si sottolinea che tale dato aumenta fino al 50% per i pazienti ricoverati in terapia intensiva, confermando come questa categoria rappresenti un gruppo ad alto rischio, non solo di sviluppare l'infezione ma anche di andare incontro ad un esito negativo della stessa. Seppur al di sotto della significatività statistica, altri fattori di rischio, quali giorni di degenza, comorbidità, utilizzo di *devices*, sono emersi nel corso del presente studio.

5.3 Comparazione del profilo genotipico e fenotipico degli isolati di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi

I test di suscettibilità agli antibiotici effettuati hanno evidenziato come la maggior parte dei ceppi analizzati risulta resistente alle principali classi di farmaci antibiotici utilizzati in terapia (cefalosporine, aminoglicosidi e fluorochinoloni).

Tali dati sono in linea con i report pubblicati in letteratura che ne evidenziano il continuo aumento in Europa a partire dal 2017, seppur con una elevata variabilità dal punto di vista geografico, con Italia e Grecia che continuano ad essere le nazioni con le più alte percentuali di cr-Kp isolate [172].

Nella gestione dei casi di malattia invasiva sostenuta da microrganismi MDR ha un ruolo prognostico chiave la prontezza nella somministrazione di un'adeguata terapia antimicrobica. Inoltre, è stato sottolineato che la somministrazione di farmaci ad ampio spettro, utilizzati come primo trattamento delle infezioni, abbia favorito, nel corso del tempo, l'insorgenza dei ceppi multi-resistenti e contribuito alla diffusione del fenomeno dell'AMR [173].

Sebbene le metodiche di tipo fenotipico siano un importante strumento di determinazione dell'AMR, in media, i tempi di analisi sono particolarmente lunghi e questo può determinare ritardi nella somministrazione della più appropriata terapia antibiotica. Al

contrario, la ricerca dei geni responsabili di antibiotico resistenza, mediante metodiche molecolari, oltre ad essere ampiamente utilizzata per la sorveglianza epidemiologica, consente di determinare la resistenza a determinati farmaci antibiotici, con una netta riduzione dei tempi di analisi [174]. Dunque, l'identificazione dei meccanismi genetici responsabili di antibiotico resistenza, tramite analisi di tipo genotipico, e le analisi fenotipiche, atte a determinare il profilo di suscettibilità agli antibiotici, sono degli strumenti che forniscono informazioni di supporto alla scelta della terapia antibiotica da mettere in atto [175].

La valutazione di eventuali correlazioni tra fenotipo e genotipo può essere utile al fine di predire il profilo di resistenza/suscettibilità, sulla base delle caratteristiche genotipiche dei ceppi. Seppur con dati preliminari, il confronto effettuato tra i diversi ceppi di *K. pneumoniae*, sulla base del differente profilo genotipico ha rilevato delle differenze sostanziali nel profilo fenotipico riscontrato. In particolare, il pattern di resistenza riscontrato nei ceppi co-produttori di KPC e OXA-48 è più ampio, rispetto ai ceppi produttori di solo KPC o co-produttori di KPC e CTX-M, evidenziando l'effetto potenziato in caso di espressione di carbapenemasi multiple. Inoltre, un profilo nettamente diverso è stato riscontrato nei ceppi non-produttori di carbapenemasi, ciò è esemplificativo di come la produzione di carbapenemasi sia il principale meccanismo responsabile di resistenza agli antibiotici nel nostro contesto ospedaliero.

Nei ceppi oggetto dello studio, la resistenza alle tradizionali terapie d'associazione, costituite da un antibiotico β -lattamico e un inibitore delle β -lattamasi (amoxicillina/acido clavulanico, piperacillina/tazobactam) è stata riscontrata in tutti i ceppi produttori di carbapenemasi; ciò è dovuto al fatto che gli inibitori delle β -lattamasi tradizionali (acido clavulanico e tazobactam) non sono dotati di attività idrolitica nei confronti delle carbapenemasi KPC, VIM, IMP, NDM ed OXA-48 [176].

La maggior parte dei ceppi sono risultati resistenti alle cefalosporine; tale dato, in linea con quanto riportato in altri studi, indica la diffusione a livello mondiale dei ceppi di *K. pneumoniae* resistente a tale categoria di farmaci. Il 30% dei ceppi di *K. pneumoniae* isolati nel 2019 in Europa sono risultati resistenti alle cefalosporine, nello specifico il tasso di resistenza registrato in Italia è maggiore del 50%, attestandosi fra le nazioni d'Europa con la più alta percentuale [177; 178].

Per quanto riguarda i carbapenemi, nessun ceppo fra quelli non produttori di carbapenemasi è risultato resistente a tale classe di farmaci antibiotici, confermando il

ruolo delle carbapenemasi nello sviluppo di un profilo fenotipico resistente ai carbapenemi.

Fra tutti gli antibiotici testati, l'amikacina è stata quella con la più bassa percentuale di ceppi resistenti (il 60%), in linea con quanto riportato in letteratura [179]. Tale classe di farmaci è spesso usata nei protocolli terapeutici per il trattamento delle infezioni sostenute da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi in associazione ai carbapenemi, alle cefalosporine o alle tetracicline [180]. Nel corso degli anni la resistenza agli aminoglicosidi ha evidenziato una tendenza di crescita a livello mondiale [181], ciò limita ulteriormente le opzioni terapeutiche disponibili.

Le nuove terapie d'associazione, CZA, M/V, I/R, rappresentano un'importante opzione terapeutica da utilizzare in caso di infezioni da batteri Gram-negativi le cui opzioni di trattamento siano limitate. Tuttavia, come già espresso, la loro efficacia contro *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi è limitata, a causa della diffusione di ceppi resistenti. I principali meccanismi che determinano tale resistenza fino ad ora identificati sono la produzione di varianti enzimatiche delle carbapenemasi e di porine mutate [182]. Nei ceppi oggetto dello studio, i valori di MIC per CZA, M/V, I/R sono risultati più alti nel gruppo di ceppi che co-esprimevano KPC e OXA-48.

Inoltre, tutti i ceppi resistenti a CZA, M/V, I/R sono risultati resistenti anche ai carbapenemi, fattore che limita ulteriormente le opzioni terapeutiche disponibili.

Tale aspetto si discosta da quanto riportato in letteratura. Infatti, sono numerosi i report che descrivono lo sviluppo di resistenza a CZA e il contemporaneo ripristino della suscettibilità ai carbapenemi in *K. pneumoniae* [183; 184]. Questo fenomeno è determinato dall'espressione di carbapenemasi mutate che mostrano elevata affinità per ceftazidime e, al contempo, ridotta affinità per i carbapenemi; di conseguenza, tali enzimi legano e idrolizzano efficacemente ceftazidime e non i carbapenemi che quindi possono esplicare la loro attività di inibizione della sintesi della parete batterica [185].

Lo spettro di attività di meropenem/vaborbactam e imipenem/relebactam comprende le carbapenemasi di classe A. Per tale ragione, sono considerati una valida alternativa da utilizzare in caso di infezione sostenuta da Gram-negativi che esprimono *bla*KPC. Inoltre, in letteratura è riportata la maggior capacità di tali farmaci di penetrare all'interno della cellula batterica [186] e, inoltre, per quanto riguarda M/V, è stata descritta la sua minore propensione di indurre resistenza durante la terapia, rispetto a CZA [187]. Tuttavia, mutazioni a carico delle porine determinano un'alterazione della permeabilità della membrana batterica tale da determinare resistenza a tali farmaci [188].

La co-produzione di carbapenemasi e porine mutate, riscontrata nei ceppi oggetto dello studio e discussa in seguito, fornisce una probabile spiegazione al profilo fenotipico di resistenza sia ai carbapenemi che alle nuove terapie d'associazione che è stato riscontrato. Il calcolo dell'*Antimicrobial Resistance Index* (ARI) ha permesso di descrivere il profilo di resistenza dei ceppi batterici analizzati. Tale indice è stato calcolato per ogni ceppo incluso nello studio, evidenziando significative differenze tra i ceppi che esprimevano diverse carbapenemasi.

Il gruppo di ceppi non-produttori di carbapenemasi (No CP) è stato quello con i più bassi valori di ARI, mentre i ceppi appartenenti al gruppo KPC/OXA-48 hanno evidenziato un significativo aumento dei valori di ARI, sia rispetto al gruppo No CP che rispetto ai gruppi KPC e KPC/CTX-M. La differenza è risultata statisticamente significativa, suggerendo che la co-espressione dei geni *blaKPC* e *blaOXA-48* può essere considerata come un marker predittivo di un profilo fenotipo multi-farmaco resistente, come quello evidenziato nei ceppi appartenenti al gruppo KPC/OXA-48 inclusi nello studio. Inoltre, l'adozione di uno *score*, come misura dell'antibiotico resistenza, consente di misurare il trend in tempi e contesti ospedalieri differenti, come indicatore anche dell'efficacia degli interventi di prevenzione messi in atto.

Il marcato profilo di resistenza riscontrato sottolinea la necessità di sviluppare nuovi farmaci o nuove terapie in combinazione per il trattamento delle infezioni severe. Attualmente, le polimixine e la fosfomicina vengono impiegate per il trattamento delle infezioni sostenute da batteri Gram-negativi che sono resistenti alle nuove terapie d'associazione [189]. Tuttavia, essi sono dei farmaci dotati di uno scarso profilo di tollerabilità, la cui somministrazione richiede un'attenta valutazione delle condizioni del paziente.

In letteratura è descritto il trattamento di infezioni da *K. pneumoniae* resistente a ceftazidime/avibactam con l'uso di una doppia combinazione di farmaci (ceftazidime/avibactam + meropenem) o con triplici combinazioni di farmaci (ceftazidime/avibactam + meropenem + fosfomicina; ceftazidime/avibactam + aztreonam + fosfomicina). Solo l'uso delle triplici combinazioni è risultato efficace nel determinare l'eradicazione dell'infezione [190].

Ad oggi, l'antibiogramma molecolare non sostituisce quello convenzionale; tuttavia, i dati esposti evidenziano come le analisi di tipo genotipico possano fornire un utile e valido supporto nell'indirizzare la scelta terapeutica, poiché permettono di determinare i meccanismi genomici alla base della resistenza e predire il profilo fenotipico.

5.4 Analisi del genoma batterico mediante *Whole Genome Sequencing*

L'analisi delle sequenze genomiche, mediante WGS, dei ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alle nuove terapie di associazione, ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam, ha permesso di approfondire i meccanismi responsabili della resistenza.

Per quanto riguarda la presenza dei geni codificanti per la carbapenemasi KPC, l'analisi delle sequenze genomiche dei ceppi ha permesso di riscontrare la presenza di KPC-3 in 2 dei 17 ceppi, mentre nella maggior parte dei ceppi (15/17) è stata identificata KPC-31. KPC-31 è una variante della più comune KPC-3; si distingue da quest'ultima per la presenza della sostituzione amminoacidica D179Y. Tale mutazione, localizzata nel sito attivo dell'enzima (posizioni amminoacidiche 163–179), in corrispondenza dell' Ω -loop, determina un'aumentata affinità tra KPC-31 e ceftazidime, e, conseguentemente, ciò ostacola il legame enzima-avibactam, determinando la resistenza a CZA [191].

Sebbene KPC-3 e KPC-2 siano le due varianti della carbapenemasi di classe A più diffuse a livello mondiale, nella maggioranza dei ceppi oggetto dello studio è stata identificata KPC-31. Tale aspetto è probabilmente attribuibile alla diffusione monoclonale di *K. pneumoniae* ST512, che, essendo dotata di un marcato profilo di resistenza agli antibiotici, è divenuta il ceppo isolato con maggiore frequenza.

Sia *bla*KPC-3 che la sua variante *bla*KPC-31 sono stati identificati nel trasposone *Tn4401*, a sua volta inserito nel plasmide IncFIB, ampiamente diffuso tra i ceppi appartenenti al CC258. Tale plasmide è caratterizzato dalla frequente presenza anche di altri determinanti genici di resistenza, fattore che determina lo sviluppo di un fenotipo di multi-farmaco resistenza [159].

Per quanto riguarda OXA-181, essa è stata identificata per la prima volta in un ceppo di *K. pneumoniae* nel 2007, in India; attualmente, è la variante di OXA-48 più diffusa a livello mondiale: è considerata endemica nel continente indiano e la sua presenza è stata segnalata in Europa, USA e Africa. Deriva dalla più comune OXA-48, con la quale differisce per la sostituzione di quattro amminoacidi (Thr104Ala, Asn110Asp, Glu168Gln, Ser171Ala) e Thr104Ala, Asn110Asp, Glu168Gln, Ser171Ala), in corrispondenza del loop β 5- β 6, fondamentale per l'attività idrolitica dell'enzima [86].

Generalmente, *bla*OXA-181 è associato al trasposone *Tn2013* e ai plasmidi IncX3, ColKP3, IncN1, IncT [43; 159]. L'analisi plasmidica ha determinato la presenza di *bla*OXA-181 nel plasmide ColKP3, recante anche *qnrS1*, gene responsabile della

resistenza ai chinoloni. La presenza di *blaOXA-181* e *qnrS1* nello stesso plasmide è stata descritta anche per un ceppo di *E. coli* ST410; tuttavia, in tal caso i due geni erano associati al plasmide IncX3; ciò sottolinea l'elevata variabilità a livello plasmidico tra i diversi microrganismi [192].

Le porine sono canali proteici disposti nella membrana cellulare batterica che consentono il passaggio trans-membrana di acqua, ioni e piccole molecole idrofile, tra cui gli antibiotici [92]. OmpK35 ed OmpK36 sono le principali porine in *K. pneumoniae*; Mutazioni a carico di *ompK35* determinano la sintesi di OmpK35 non funzionale, mentre la mutazione a carico di *ompK36* determina l'espressione di OmpK36GD, caratterizzata da una sostituzione amminoacidica in corrispondenza della regione loop 3 (L3). In entrambi i casi, ciò determina la formazione porine con un'alterata attività che si traduce nel mancato passaggio delle molecole nell'ambiente intracellulare [193]. Il troncamento di OmpK35 e la produzione di OmpK36GD che sono stati rilevati nei ceppi sequenziati concorrono alla determinazione del fenotipo di resistenza estesa (XDR) e pan-resistenza (PDR) rilevato, come già riportato in letteratura [194].

6. Conclusioni

La diffusione di ceppi batterici antibiotico resistenti è una delle più rilevanti minacce alla salute pubblica globale, con importanti ripercussioni sulla gestione clinica dei pazienti, considerata la morbilità e la letalità determinata da tali microrganismi [2].

I meccanismi responsabili della resistenza agli antibiotici sono molteplici e il loro studio è fondamentale, sia al fine di applicare efficaci strategie di contrasto del fenomeno che per mettere a punto nuove terapie antibiotiche, capaci di superare tali meccanismi di resistenza. Questi obiettivi, in linea con quanto espresso nel Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico Resistenza, sono perseguibili attraverso azioni ascrivibili alle seguenti aree tematiche d'intervento: formazione, informazione, comunicazione, ricerca, cooperazione nazionale e internazionale [7].

Lo studio condotto ha permesso di evidenziare la rapida diffusione monoclonale di *K. pneumoniae* ST512 caratterizzata dalla co-produzione di carbapenemasi di classe A e D, in ambito nosocomiale. I geni codificanti tali enzimi hanno localizzazione plasmidica, dunque possono essere integrati nel genoma batterico di altri ceppi, tramite eventi di trasferimento genomico, contribuendo alla selezione ed alla conseguente diffusione di microrganismi dotati di un corredo genetico tale da determinare resistenza a molteplici categorie di farmaci antibiotici, come rilevato dalle analisi fenotipiche effettuate.

L'analisi dei dati raccolti durante il periodo di osservazione ha permesso di valutare potenziali fattori di rischio che concorrono a determinare lo stato di infezione nei pazienti colonizzati da *K. pneumoniae* co-produttrice di KPC e OXA-48. Tra questi, il ricovero in terapia intensiva si conferma un importante fattore di rischio, unitamente alla presenza di comorbidità. Tale aspetto sottolinea la necessità di implementare le misure di prevenzione e contenimento, specialmente all'interno di tale tipologia di reparto. In particolare, risultano essenziali interventi di screening mirati, che consentano la tempestiva identificazione dei casi di colonizzazione e che rientrano nelle pratiche di prevenzione delle infezioni e delle colonizzazioni (IPC) unitamente a: igiene delle mani, isolamento dei pazienti, pratiche adeguate di pulizia degli ambienti e disinfezione degli strumenti, indagini mirate in caso di *outbreaks*, uso razionale e consapevole degli antibiotici [52].

A seguito dell'immissione in commercio delle nuove terapie d'associazione (ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam), l'approccio terapeutico per il trattamento delle infezioni da Gram-negativi resistenti ai carbapenemi

ha subito importanti cambiamenti, da qui la necessità di approfondire l'insorgenza di *pattern* di resistenza anche a tali antibiotici.

La comparazione tra profilo fenotipico e genotipico ha fornito delle informazioni che possono essere di supporto alla pratica clinica, utili nell'indirizzare la scelta della più adeguata terapia antibiotica, nel più breve tempo possibile. Sebbene ulteriori indagini siano necessarie al fine di approfondire il ruolo dei vari meccanismi di resistenza nel determinare il fenotipo AMR, i dati esposti hanno evidenziato significative differenze nel profilo di suscettibilità agli antibiotici sulla base dell'espressione dei geni di resistenza, con quasi la totalità dei ceppi co-produttori di KPC e OXA-48 resistenti a tutte le classi di farmaci antibiotici.

Inoltre, il calcolo dell'*Antimicrobial Resistance Index* per i microrganismi presi in esame ha evidenziato la sua potenziale utilità nel confrontare i ceppi in base al loro profilo di antibiotico resistenza usando un approccio standard, in grado di agevolare il confronto fra realtà diverse e osservare la tendenza nel corso del tempo.

Le analisi di sequenza effettuate hanno consentito di analizzare il genoma dei microrganismi con maggiore precisione rispetto alle metodiche molecolari di uso corrente, consentendo l'identificazione di oltre 20 geni responsabili di AMR, tra cui le varianti enzimatiche KPC-31 e OXA-181, e le mutazioni a carico dei geni che codificano per porine. Le suddette metodiche possono offrire un valido supporto alla pratica clinica, in quanto forniscono informazioni utili sia per l'identificazione dei microrganismi responsabili di malattia invasiva che all'interno della sorveglianza epidemiologica nell'individuare prontamente l'insorgenza di nuove varianti.

L'implementazione delle tecniche molecolari, dall'amplificazione al sequenziamento genomico, ha permesso enormi progressi negli ultimi decenni in ambito scientifico e ha posto le basi per lo sviluppo della cosiddetta medicina personalizzata. L'applicazione di tali metodiche, anche nel campo delle malattie infettive e nello sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici, rappresenta un elemento chiave nel contrasto all'AMR, sia nella comprensione del quadro epidemiologico che nella possibilità di mettere a punto terapie su misura che migliorino l'esito dei casi di malattie batteriche invasive sostenute da microrganismi MDR.

Bibliografia

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Review on Antimicrobial Resistance, 2016
3. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022 Jan 18:S0140-6736(21)02724-0. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub ahead of print. PMID: 35065702
4. <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/articles/causesofdeathover100years/2017-09-18>
5. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
6. Fleming A., "Penicillin" Nobel Lecture, December 11, 1945, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>
7. Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza 2022-2025 (PNCAR)
8. Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. L'uso dei farmaci in Italia. Rapporto Nazionale Anno 2018. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco, 2019
9. Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. L'uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2020. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco, 2022
10. Morgan DJ, Okeke IN, Laxmanirayan R, Perencevich EN, Weisenberg S, Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review, Lancet Infectious Diseases, 2011, 11, 9, 692-701
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017
12. 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. Alessandro Cassini, Liselotte Diaz Högberg, Diamantis Plachouras, Annalisa Quattrocchi, Ana Hoxha, Gunnar Skov Simonsen, Mélanie Colomb-Cotinat, Mirjam E Kretzschmar, Brecht Devleesschauwer, Michele Cecchini, Driss Ait Ouakrim, Tiago Cravo Oliveira, Marc J Struelens, Carl Suetens, Dominique L Monnet, and the Burden of AMR Collaborative Group
13. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022 Jan 18:S0140-6736(21)02724-0. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub ahead of print. PMID: 35065702
14. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health>

15. Young KM, Isada MJ, Reist M, Uhland FC, Sherk LM, Carson CA. A scoping review of the distribution and frequency of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in shrimp and salmon. *Epidemiol Infect.* 2022 Dec 5;151:e1. doi: 10.1017/S0950268822001819. PMID: 36606359
16. Valiatti TB, Cayô R, Santos FF, Bessa-Neto FO, Brandão Silva RG, Veiga R, de Nazaré Miranda Bahia M, Guerra LMGD, Pignatari ACC, de Oliveira Souza C, Brasiliense DM, Gales AC; Guarani Network. Genomic Analysis of *Klebsiella pneumoniae* ST258 Strain Coproducing KPC-2 and CTX-M-14 Isolated from Poultry in the Brazilian Amazon Region. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Dec 17;11(12):1835. doi: 10.3390/antibiotics11121835. PMID: 36551493; PMCID: PMC9774611
17. Bonardi S, Cabassi CS, Fiaccadori E, Cavirani S, Parisi A, Bacci C, Lamperti L, Rega M, Conter M, Marra F, Crippa C, Gambi L, Spadini C, Iannarelli M, Paladini C, Filippin N, Pasquali F. Detection of carbapenemase- and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from bovine bulk milk and comparison with clinical human isolates in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2023 Feb 16;387:110049. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110049. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36521239
18. Wyres, K.L., Holt, K.E., 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 131–139
19. Doron S, Davidson LE. Antimicrobial stewardship. *Mayo Clin Proc.* 2011 Nov;86(11):1113-23. doi: 10.4065/mcp.2011.0358. PMID: 22033257; PMCID: PMC3203003.
20. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, Srinivasan A, Dellit TH, Falck-Ytter YT, Fishman NO, Hamilton CW, Jenkins TC, Lipsett PA, Malani PN, May LS, Moran GJ, Neuhauser MM, Newland JG, Ohl CA, Samore MH, Seo SK, Trivedi KK. Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis.* 2016 May 15;62(10):e51-77. doi: 10.1093/cid/ciw118.
21. Nampoothiri, V., Bonaconsa, C., Surendran, S., Mbamalu, O., Nambatya, W., Ahabwe Babigumira, P., Ahmad, R., Castro-Sanchez, E., Broom, A., Szymczak, J., Zingg, W., Gilchrist, M., Holmes, A., Mendelson, M., Singh, S., McLeod, M., & Charani, E. (2021). What does antimicrobial stewardship look like where you are? Global narratives from participants in a massive open online course. *JAC-antimicrobial resistance*, 4(1), dlab186. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab186>

22. Guidelines for ATC classification and DDD assignment, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo
23. Menichetti et al., The GISA call to action for the appropriate use of antimicrobials and the control of antimicrobial resistance in Italy
24. Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study Alessandro Cassini, Diamantis Plachouras, Tim Eckmanns, Muna Abu Sin, Hans-Peter Blank, Tanja Ducomble, Sebastian Haller, Thomas Harder, Anja Klingeberg, Madlen Sixtensson, Edward Velasco, Bettina Weiß, Piotr Kramarz, Dominique L. Monnet, Mirjam E. Kretzschmar, Carl Suetens
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019
26. WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization, 2011
27. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2020. Stockholm: ECDC; 2022.
28. World Health Organization. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics
29. Stecher B. The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiol Spectr* 2015
30. Colonisation resistance against multidrug-resistant bacteria: a narrative review Rémi Le Guern, Sarah Stabler, Philippe Gosset, Muriel Pichavant, Teddy Grandjean, Emmanuel Faure, Yasemin Karaca, Karine Faure, Eric Kipnis, Rodrigue Des
31. Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain JM. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. *Euro Surveill.* 2014;19(20):pii=20809. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20809>
32. <https://www.who.int/initiatives/glass>; Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
33. Friedlaender, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv f. pathol. Anat.* 87, 319–324 (1882). <https://doi.org/10.1007/BF01880516>
34. Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control* 6,52–58. doi: 10.1017/S0195941700062603

35. Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., and Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3325–3327. doi: 10.1128/AEM.67. 7.3325-3327.2001
36. Jarvis, W. R., Munn, V. P., Highsmith, A. K., Culver, D. H., and Hughes, J. M. (1985). The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Control* 6, 68–74. doi: 10.1017/S0195941700062639; Davis T J, Matsen J M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. *J Infect Dis.* 1974;130:402–405
37. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* 2014 Dec;22(12):686-96. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25304194; PMCID: PMC4365952
38. Chen L, Mathema B, Pitout JD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. *mBio.* 2014 Jun 24;5(3):e01355-14. doi: 10.1128/mBio.01355-14. PMID: 24961694; PMCID: PMC4073492
39. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch Intern Med.* 1991 Aug;151(8):1557-9. PMID: 1872659
40. Lee SS, Chen YS, Tsai HC, Wann SR, Lin HH, Huang CK, Liu YC. Predictors of septic metastatic infection and mortality among patients with *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. *Clin Infect Dis.* 2008 Sep 1;47(5):642-50. doi: 10.1086/590932. PMID: 18643760
41. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 2013; 4:1–12
42. Patel PK, Russo TA, Karchmer AW. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infect Dis.* 2014;1(1):ofu028. Published 2014 Jun 2. doi:10.1093/ofid/ofu028
43. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 2019 May 15;32(3):e00001-19. doi: 10.1128/CMR.00001-19. PMID: 31092506; PMCID: PMC6589860
44. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. 2004. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 199:697–705
45. Fu L, Tang L, Wang S, Liu Q, Liu Y, Zhang Z, Zhang L, Li Y, Chen W, Wang G, Zhou Y. 2018. Co-location of the blaKPC-2, blaCTX-M-65, rmtB and virulence relevant factors in

- an IncFII plasmid from a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Microb Pathog* 124:301–304
46. Nadasy KA, Domiati-Saad R, Tribble MA. Invasive *Klebsiella pneumoniae* syndrome in North America. *Clin Infect Dis*. 2007 Aug 1;45(3):e25-8. doi: 10.1086/519424. Epub 2007 Jun 18. PMID: 17599300
 47. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul;20(7):1170-5. doi: 10.3201/eid2007.121004. PMID: 24959688; PMCID: PMC4073868
 48. Debby BD, Ganor O, Yasmin M, David L, Nathan K, Ilana T, Dalit S, Smollan G, Galia R. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;31(8):1811-7. doi: 10.1007/s10096-011-1506-5. Epub 2012 Jan 14. PMID: 22246509
 49. Nordmann, P. 1998. Trends in b-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin. Infect. Dis*. 27(Suppl.):S100–S106
 50. Wei DD, Wan LG, Deng Q, Liu Y. 2016. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clone of capsular serotype K1 that belongs to sequence type 11 in mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85:192–194
 51. Fu L, Tang L, Wang S, Liu Q, Liu Y, Zhang Z, Zhang L, Li Y, Chen W, Wang G, Zhou Y. 2018. Co-location of the blaKPC-2, blaCTX-M-65, rmtB and virulence relevant factors in an IncFII plasmid from a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Microb Pathog* 124:301–304
 52. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, Chan EW, Shu L, Yu J, Zhang R, Chen S. 2017. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 18:37–46
 53. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Jun 15;80(3):629-61. doi: 10.1128/MMBR.00078-15. PMID: 27307579; PMCID: PMC4981674.
 54. Kanazuru T, Sato EF, Nagata K, Matsui H, Watanabe K, Kasahara E, et al. Role of hydrogen generation by *Klebsiella pneumoniae* in the oral cavity. *Journal of microbiology*. 2010;48(6):778-83
 55. Iwahi T, Abe Y, Nakao M, Imada A, Tsuchiya K. Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice.

- Infection and Immunity. 1983;39(3):1307-15
56. Compare D, Nardone G. The bacteria-hypothesis of colorectal cancer: pathogenetic and therapeutic implications. *Translational Gastrointestinal Cancer*; Vol 3, No 1 (January 2014): *Translational Gastrointestinal Cancer*. 2013
 57. Kaur CP, Vadivelu J, Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J Dig Dis*. 2018 May;19(5):262-271. doi: 10.1111/1751-2980.12595. Epub 2018 May 20. PMID: 29573336
 58. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Oct;11(4):589-603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589. PMID: 9767057; PMCID: PMC88898
 59. Le Guern R, Stabler S, Gosset P, Pichavant M, Grandjean T, Faure E, Karaca Y, Faure K, Kipnis E, Dessein R. Colonization resistance against multi-drug-resistant bacteria: a narrative review. *J Hosp Infect*. 2021 Dec;118:48-58. doi: 10.1016/j.jhin.2021.09.001. Epub 2021 Sep 4. PMID: 34492304
 60. Martin RM, Cao J, Brisse S, et al. Molecular Epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* 2016; 1:e00261-16.
 61. Juan CH, Chou SH, Chen IR, Yang CI, Lin YT, Chen L. Intestinal colonisation with hypervirulent or third-generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains upon hospital admission in a general ward in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2022 Aug;60(2):106624. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106624. Epub 2022 Jun 18. PMID: 35728713
 62. Tischendorf J, de Avila RA, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2016. Epub 2016/02/24
 63. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, Pratt NF, Garlick JS, Watson KM, Pilcher DV, McGloughlin SA, Spelman DW, Jenney AWJ, Holt KE. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017 Jul 15;65(2):208-215. doi: 10.1093/cid/cix270. PMID: 28369261; PMCID: PMC5850561
 64. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, Filos KS. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Dec;67(12):2976-81. doi: 10.1093/jac/dks316. Epub 2012 Aug 26. PMID: 22927316
 65. Dickstein Y, Edelman R, Dror T, Hussein K, Bar-Lavie Y, Paul M. Carbapenem-resistant

- Enterobacteriaceae colonization and infection in critically ill patients: a retrospective matched cohort comparison with non-carriers. *J Hosp Infect.* 2016 Sep;94(1):54-9. doi: 10.1016/j.jhin.2016.05.018. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27392978
66. Dautzenberg MJ, Wekesa AN, Gniadkowski M, Antoniadou A, Giamarellou H, Petrikos GL, Skiada A, Brun-Buisson C, Bonten MJ, Derde LP; Mastering hOSpital Antimicrobial Resistance in Europe Work Package 3 Study Team. The association between colonization with carbapenemase-producing enterobacteriaceae and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med.* 2015 Jun;43(6):1170-7. doi: 10.1097/CCM.0000000000001028. PMID: 25882764; PMCID: PMC4431676
67. McConville TH, Sullivan SB, Gomez-Simmonds A, Whittier S, Uhlemann AC. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS One.* 2017 Oct 12;12(10):e0186195. doi: 10.1371/journal.pone.0186195. PMID: 29023567; PMCID: PMC5638409
68. Rao K, Patel A, Sun Y, Vornhagen J, Motyka J, Collingwood A, Teodorescu A, Baang JH, Zhao L, Kaye KS, Bachman MA. Risk Factors for Klebsiella Infections among Hospitalized Patients with Preexisting Colonization. *mSphere.* 2021 Jun 30;6(3):e0013221. doi: 10.1128/mSphere.00132-21. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34160237; PMCID: PMC8265626
69. Kernéis S, Lucet JC, Santoro A, Meschiari M. Individual and collective impact of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing K. pneumoniae in patients admitted to the ICU. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Jan 29;76(Suppl 1):i19-i26. doi: 10.1093/jac/dkaa494. PMID: 33534878
70. Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC. Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med.* 1971 May;74(5):657-64. doi: 10.7326/0003-4819-74-5-657. PMID: 5559431
71. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia.* 1996 Mar;12(1):9-16. PMID: 9019139.
72. Abraham, E. P., and E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837
73. Bonomo RA. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Jan 3;7(1):a025239. doi: 10.1101/cshperspect.a025239. PMID: 27742735; PMCID: PMC5204326
74. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980

- May 16;289(1036):321-31. doi: 10.1098/rstb.1980.0049. PMID: 6109327
75. Bush, K., Bradford, P.A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* 17, 295–306 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
76. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016 Jun 13;7:895. doi: 10.3389/fmicb.2016.00895. PMID: 27379038; PMCID: PMC4904035
77. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1151-61. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):809. PMID: 11257029; PMCID: PMC90438.
78. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep;13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7. PMID: 23969216; PMCID: PMC4673667
79. Vena A, Castaldo N, Bassetti M. The role of new β -lactamase inhibitors in gram-negative infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2019 Dec;32(6):638-646. doi: 10.1097/QCO.0000000000000600. PMID: 31577557
80. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 May 13;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19. PMID: 32404435; PMCID: PMC7227449.
81. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, Jeong BC, Lee SH. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci*. 2015 Apr 29;16(5):9654-92. doi: 10.3390/ijms16059654. PMID: 25938965; PMCID: PMC4463611
82. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009

- Dec;53(12):5046-54. doi: 10.1128/AAC.00774-09. Epub 2009 Sep 21. PMID: 19770275; PMCID: PMC2786356
83. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):381-93. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70056-1. PMID: 21530894
84. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00036-08. PMID: 19136439; PMCID: PMC2620637
85. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09. Epub 2009 Dec 7. PMID: 19995920; PMCID: PMC2825993
86. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Nov 13;33(1):e00102-19. doi: 10.1128/CMR.00102-19. PMID: 31722889; PMCID: PMC6860007
87. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22. doi: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004. PMID: 14693513; PMCID: PMC310167
88. Woerther P-L, Jardak T, Ben Hassine I, Forget S, Chachaty E, Arlet G, Decré D. 2018. A long-term study of the diversity of OXA-48-like carbapenemase-producing bacterial strains in infected patients and carriers. *Microb Drug Resist* 24:181–189
89. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan;56(1):559-62. doi: 10.1128/AAC.05289-11. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22083465; PMCID: PMC3256075
90. Janelle SJ, Kallen A, de Man T, et al. Notes from the Field: New Delhi Metallo- β -Lactamase–Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Identified in Patients Without Known Health Care Risk Factors — Colorado, 2014–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1414–1415.
91. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):103-6. doi: 10.3201/eid1701.101358. PMID: 21192866; PMCID: PMC3204653.
92. European Centre for Disease Prevention and Control. Regional outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Italy, 2018–

2019 – 4 June 2019. ECDC: Stockholm; 2019.

93. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, Herruzo R, Pérez-Vázquez M, Astray J, García-Rodríguez J, Ruiz-Velasco LM, Campos J, de Burgos C, Ruiz-Carrascoso G. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Aug;46(2):169-73. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001. Epub 2015 Apr 30. PMID: 25982912
94. Arpin C, Noury P, Boraud D, Coulange L, Manetti A, André C, M'Zali F, Quentin C. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jun;56(6):3432-4. doi: 10.1128/AAC.00230-12. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22450982; PMCID: PMC3370718.
95. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Aug;69(8):2091-7. doi: 10.1093/jac/dku105. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24739146.
96. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010 Sep;10(9):597-602. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2. Epub 2010 Aug 10. PMID: 20705517; PMCID: PMC2933358.
97. Qin S, Fu Y, Zhang Q, Qi H, Wen JG, Xu H, Xu L, Zeng L, Tian H, Rong L, Li Y, Shan L, Xu H, Yu Y, Feng X, Liu HM. High incidence and endemic spread of NDM-1-positive *Enterobacteriaceae* in Henan Province, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Aug;58(8):4275-82. doi: 10.1128/AAC.02813-13. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24777095; PMCID: PMC4136005
98. Eda R, Nakamura M, Takayama Y, Maehana S, Nakano R, Yano H, Kitasato H. Trends and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Japanese hospital from 2006 to 2015. *J Infect Chemother*. 2020 Jul;26(7):667-671. doi: 10.1016/j.jiac.2020.02.002. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32222331
99. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):821-30. doi:

- 10.1111/1469-0691.12719. PMID: 24930781.
100. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalié L, van der Meer Marquet N, de Champs C, Aissa N, Eloy C, Blanc V, Guyeux C, Hocquet D, Lavigne JP, Bertrand X; ONERBA. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Dec;20(12):O1121-3. doi: 10.1111/1469-0691.12727. Epub 2014 Jul 29. PMID: 24942039.
 101. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R; AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti A, Pagani L, Luzzaro F, Rossolini GM. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill*. 2013 May 30;18(22):20489. PMID: 23787077.
 102. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3463-4. doi: 10.1128/AAC.00543-08. Epub 2008 Jul 21. PMID: 18644970; PMCID: PMC2533501.
 103. Kola A, Piening B, Pape UF, Veltzke-Schlieker W, Kaase M, Geffers C, Wiedenmann B, Gastmeier P. An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing *Klebsiella pneumoniae* associated to duodenoscopy. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015 Mar 25;4:8. doi: 10.1186/s13756-015-0049-4. PMID: 25815166; PMCID: PMC4374528.
 104. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1660-5. doi: 10.1093/jac/dks124. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22532467.
 105. Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, Toyama M, Matsui M, Shibayama K, Arakawa Y. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(1):79-81. doi: 10.7883/yoken.66.79. PMID: 23429093
 106. Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun;30(2):523-537. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.011. PMID: 27208771; PMCID: PMC4878400
 107. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic

- Resistance. 2014 Feb 6. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014–. PMID: 24649502
108. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004 Jun;42(6):2701-6. doi: 10.1128/JCM.42.6.2701-2706.2004. PMID: 15184455; PMCID: PMC427859
109. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Aug 28;17(17):6278. doi: 10.3390/ijerph17176278. PMID: 32872324; PMCID: PMC7503635
110. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 May 1;41(3):276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010. PMID: 28369412.
111. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2:ofv050. doi:10.1093/ofid/ofv050
112. de Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM et al. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM Global Surveillance Study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3163–9
113. FDA Approves Antibiotic to Treat Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-antibiotic-treat-hospital-acquired-bacterial-pneumonia-and-ventilator-associated> (accessed on 22 November 2022)
114. Zhang Y, Zhao C, Wang Q et al. Evaluation of the in vitro activity of new polymyxin B analogue SPR206 against clinical MDR, colistin-resistant and tigecycline-resistant Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 2609–15
115. Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and vaborbactam: stepping up the battle against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy*. 2018;38:444-461. doi: 10.1002/phar.2092
116. Kinn PM, Chen DJ, Gihring TM, et al. In vitro evaluation of meropenem-vaborbactam against clinical CRE isolates at a tertiary care center with low KPC-mediated carbapenem resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;93:258-260.

doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.017

117. Pfaller MA, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK, Castanheira M. In vitro activity of meropenem/vaborbactam and characterisation of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the 2015 meropenem/vaborbactam surveillance programme. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52:144-150. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.02.02
118. Blizzard T, Chen H, Kim S, et al. Discovery of MK-7655, a β -lactamase inhibitor for combination with Primaxin®. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24:780-785. doi:10.1016/j.bmcl.2013.12.101
119. Shi Q, Yin D, Han R, Guo Y, Zheng Y, Wu S, Yang Y, Li S, Zhang R, Hu F. 2020. Emergence and recovery of ceftazidime-avibactam resistance in blaKPC-33-harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolates in China. *Clin Infect Dis* 71: S436–s439. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1521>
120. Oueslati S, Iorga BI, Tlili L, Exilie C, Zavala A, Dortet L, Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Naas T. 2019. Unraveling ceftazidime/avibactam resistance of KPC28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother* 74:2239–2246. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz209>
121. Ding L, Shi Q, Han R, Yin D, Wu S, Yang Y, Guo Y, Zhu D, Hu F. Comparison of Four Carbapenemase Detection Methods for blaKPC-2 Variants. *Microbiol Spectr*. 2021 Dec 22;9(3):e0095421. doi: 10.1128/Spectrum.00954-21. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34935416; PMCID: PMC8693920
122. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*. 2017;243:16-24
123. Antimicrobial Resistance: World Health Organization. 2021; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
124. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations. 2019; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publicationsdata/ecdc-strategic-framework-integration-molecular-and-genomic-typing-european>; European Centre for Disease Prevention and Control. COVID-19 surveillance guidance - Transition from COVID-19 emergency surveillance to routine surveillance of respiratory pathogens. 2021; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-surveillance-guidance>

125. NIHR Global Health Research Unit on Genomic Surveillance of AMR, Whole-genome sequencing as part of national and international surveillance programmes for antimicrobial resistance: a roadmap. *BMJ Global Health*, 2020. 5(11): p. e002244
126. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. Stockholm: ECDC; 2011
127. Protocollo Operativo per la Sorveglianza e Gestione dei Pazienti con Colonizzazione/Infezione da Enterobacteriaceae CPE/CRE, 27 September 2019. AOU Sassari. Available online: https://www.aousassari.it/documenti/11_393_20190328122930.pdf
128. Acute trust toolkit for the early detection, management and control of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Public Health England; ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug -resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2014
129. Del Rio A, Muresu N, Sotgiu G, Saderi L, Sechi I, Cossu A, Usai M, Palmieri A, Are BM, Deiana G, Cocuzza C, Martinelli M, Calaresu E, Piana AF. High-Risk Clone of *Klebsiella pneumoniae* Co-Harboring Class A and D Carbapenemases in Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Feb 24;19(5):2623. doi: 10.3390/ijerph19052623. PMID: 35270321; PMCID: PMC8909938
130. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008 Jun;36(5):309-32. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002. Erratum in: *Am J Infect Control*. 2008 Nov;36(9):655. PMID: 18538699
131. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988
132. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types using a biochemical test in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, vol. 56, n°12, 6437-6440

133. Dice L. R. Measure of amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302 (1945)
134. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–9
135. Clinical Breakpoints of EUCAST v.11.0. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 22 November 2022)
136. De Socio GV, Rubbioni P, Botta D, Cenci E, Belati A, Paggi R, Pasticci MB, Mencacci A. Measurement and prediction of antimicrobial resistance in bloodstream infections by ESKAPE pathogens and *Escherichia coli*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Dec;19:154-160. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.013. Epub 2019 May 18. PMID: 31112804
137. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i890
138. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
139. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-477
140. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075
141. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-2069
142. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:595
143. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom*. 2016;2(12):e000102
144. Lam MMC, Wick RR, Judd LM, Holt KE, Wyres KL. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. *Microb Genom*. 2022;8(3):000800
145. Lam, MMC. et al. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications* (2021)
146. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(1):101-109

147. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H (2014) PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother* 58(7) 3895-903
148. Sheppard AE, Stoesser N, German-Mesner I, et al. TETyper: a bioinformatic pipeline for classifying variation and genetic contexts of transposable elements from short-read whole-genome sequencing data. *Microb Genom.* 2018;4(12):e000232
149. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691-3693
150. Gardner SN, Slezak T, Hall BG. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. *Bioinformatics.* 2015;31(17):2877-2878
151. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-274
152. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey016
153. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol.* 2018;67(5):901-904
154. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W296
155. WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1
156. Sotgiu G, Are BM, Pesapane L, Palmieri A, Muresu N, Cossu A, Dettori M, Azara A, Mura II, Cocuzza C, Aliberti S, Piana A. Nosocomial transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian university hospital: a molecular epidemiological study. *J Hosp Infect.* 2018 Aug;99(4):413-418. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.033. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29621600
157. Bellich, B.; Lagatolla, C.; Rizzo, R.; D'Andrea, M.M.; Rossolini, G.M.; Cescutti, P. Determination of the capsular polysaccharide structure of the *Klebsiella pneumoniae* ST512 representative strain KPB-1 and assignments of the glycosyltransferases functions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 155, 315–323
158. Conte V, Monaco M, Giani T, D'Ancona F, Moro ML, Arena F, D'Andrea MM,

- Rossolini GM, Pantosti A; AR-ISS Study Group on Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Dec;71(12):3386-3391. doi: 10.1093/jac/dkw337. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27585968
159. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct;59(10):5873-84. doi: 10.1128/AAC.01019-15. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26169401; PMCID: PMC4576115
160. Data from the ECDC Surveillance Atlas—Antimicrobial Resistance. 2021. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
161. 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.; et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): A prospective, multinational study. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 17, 153–163
162. Bovo F, Lombardo D, Lazzarotto T, Ambretti S, Gaibani P. Epidemiology and In Vitro Activity of Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam and Imipenem/Relebactam against KPC-Producing *K. pneumoniae* Collected from Bacteremic Patients, 2018 to 2020. *Antibiotics (Basel).* 2022 Nov 14;11(11):1621. doi: 10.3390/antibiotics11111621. PMID: 36421265; PMCID: PMC9686929
163. Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Aug 16;66(8):e0021622. doi: 10.1128/aac.00216-22. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35856662; PMCID: PMC9380527
164. Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Doyle TB, Sader HS. Prevalence of carbapenemase genes among carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriales collected in US hospitals in a five-year period and activity of ceftazidime/avibactam and comparator agents. *JAC Antimicrob Resist.* 2022 Sep 30;4(5):dlac098. doi: 10.1093/jacamr/dlac098. PMID: 36196444; PMCID: PMC9524567
165. Bulman ZP, Krapp F, Pincus NB et al. Genomic features associated with the degree of phenotypic resistance to carbapenems in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *mSystems* 2021; 6: e0019421. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00194-21>

166. Chen, C.-M.; Guo, M.-K.; Ke, S.-C.; Lin, Y.-P.; Li, C.-R.; Vy Nguyen, H.T.; Wu, L.-T. Emergence and nosocomial spread of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48 and KPC-2 in a regional hospital in Taiwan. *J. Med. Microbiol.* 2018, 67, 957–964
167. Meletis, G.; Chatzidimitriou, D.; Malisiovas, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: The excessively armored bacilli of the current decade. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2015, 34, 1487–1493
168. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3:15–21. <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
169. van Loon K, Voor in 't holt AF, Vos MC. 2018. A systematic review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01730-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01730-17>
170. Segagni Lusignani L, Presterl E, Zatorska B, Van den Nest M, Diab-Elschahawi M. Infection control and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. A 5 year (2011-2016) case-control study. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020 Jan 17;9(1):18. doi: 10.1186/s13756-019-0668-2. PMID: 31988746; PMCID: PMC6969403
171. Incidence of infection with multidrug-resistant Gram-negative bacteria and vancomycin-resistant enterococci in carriers: a systematic review and meta-regression analysis
172. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2021. Stockholm: ECDC; 2022. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2021_2022-final.pdf
173. Bassetti M, Akova M, Tumbarello M. Treatment and mortality of *Klebsiella pneumoniae* infections in critically ill patients: should we do and predict them better? *Intensive Care Med.* 2018;44(11):1982–1984. doi:10.1007/s00134-018-5390-7
174. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018 Apr 3;66(8):1290-1297. doi: 10.1093/cid/cix893. PMID: 29165604; PMCID: PMC5884739
175. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019 Nov 13;69(Suppl 7):S521-S528. doi: 10.1093/cid/ciz824. PMID: 31724045; PMCID: PMC6853758

176. Stewart A, Harris P, Henderson A, Paterson D. Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Oct 24;62(11):e01195-18. doi: 10.1128/AAC.01195-18. PMID: 30104282; PMCID: PMC6201068
177. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
178. Mohd Asri, N.A.; Ahmad, S.; Mohamud, R.; Mohd Hanafi, N.; Mohd Zaidi, N.F.; Irekeola, A.A.; Shueb, R.H.; Yee, L.C.; Mohd Noor, N.; Mustafa, F.H.; et al. Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics* 2021, 10, 1508
179. Alzahrani OM, Uddin F, Mahmoud SF, Alswat AS, Sohail M, Youssef M. Resistance to Some New Drugs and Prevalence of ESBL- and MBL-Producing Enterobacteriaceae Uropathogens Isolated from Diabetic Patients. *Life (Basel).* 2022 Dec 16;12(12):2125. doi: 10.3390/life12122125. PMID: 36556490; PMCID: PMC9788504
180. Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother* 2016; 17:761–81
181. Zhang Y, Li W, Tian X, Sun R, Zhou S, Jia L, Sun J, Liao XP, Liu YH, Yu Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Recovered from a Single Hospital in China, 2013 to 2017. *Infect Drug Resist.* 2022 Dec 23;15:7679-7690. doi: 10.2147/IDR.S393155. PMID: 36582450; PMCID: PMC9793792
182. Gaibani, P.; Giani, T.; Bovo, F.; Lombardo, D.; Amadesi, S.; Lazzarotto, T.; Coppi, M.; Rossolini, G.M.; Ambretti, S. Resistance to Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam and Imipenem/Relebactam in Gram-Negative MDR Bacilli: Molecular Mechanisms and Susceptibility Testing. *Antibiotics* 2022, 11, 628
183. Oueslati S, Iorga BI, Tlili L, et al. Unravelling ceftazidime/avibactam resistance of KPC-28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:2239e46;
184. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Chen L, Kreiswirth BN, Clancy CJ. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance and Restoration of Carbapenem Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K pneumoniae*: A Case Report and Review of Literature. *Open Forum Infect Dis.* 2017 Jul 1;4(3):ofx101. doi: 10.1093/ofid/ofx101. PMID: 28685153; PMCID: PMC5493938

185. van Asten, S.A.V.; Boattini, M.; Kraakman, M.E.M.; Bianco, G.; Iannaccone, M.; Costa, C.; Cavallo, R.; Bernardis, A.T. Ceftazidime avibactam resistance and restoration of carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: A case series. *J. Infect. Chemother.* 2021, 27, 778–780
186. Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2019;15(2):133-49
187. Pogue JM, Bonomo RA, Kaye KS. Ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam or both? Clinical and formulary considerations. *Clin Infect Dis.* 2019;68(3):519-24
188. Dulyayangkul P, Wan Nur Ismah WAK, Douglas EJA, Avison MB. Mutation of *kvrA* causes OmpK35 and OmpK36 porin downregulation and reduced meropenem-vaborbactam susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(7):e02208-19
189. Bassetti M, Kanj SS, Kiratisin P, Rodrigues C, Van Duin D, Villegas MV, Yu Y. Early appropriate diagnostics and treatment of MDR Gram-negative infections. *JAC Antimicrob Resist.* 2022 Sep 13;4(5):dlac089. doi: 10.1093/jacamr/dlac089. PMID: 36111208; PMCID: PMC9469888
190. Galani, I.; Karaiskos, I.; Souli, M.; Papoutsaki, V.; Galani, L.; Gkoufa, A.; Antoniadou, A.; Giamarellou, H. Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019. *Eurosurveillance* 2020, 25, 2000028
191. Haidar, G.; Clancy, C.J.; Shields, R.K.; Hao, B.; Cheng, S.; Nguyena, M.H. Mutations in *blaKPC-3* that confer ceftazidime-avibactam resistance encode novel KPC-3 variants that function as extended spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, e02534-16
192. Hammerum AM, Littauer P, Hansen F. 2015. Detection of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-7 and OXA-181, *Escherichia coli* producing NDM-5 and *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in a single patient. *Int J Antimicrob Agents* 46:597–598
193. Wong, J.L.C.; Romano, M.; Kerry, L.E.; Kwong, H.S.; Low, W.W.; Brett, S.J.; Clements, A.; Beis, K.; Frankel, G. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nat. Commun.* 2019, 10, 3957
194. Muresu N, Del Rio A, Fox V, Scutari R, Alteri C, Are BM, Terragni P, Sechi I,

Sotgiu G, Piana A. Genomic Characterization of KPC-31 and OXA-181 *Klebsiella pneumoniae* Resistant to New Generation of β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Antibiotics* (Basel). 2022 Dec 21;12(1):10. doi: 10.3390/antibiotics12010010. PMID: 36671211; PMCID: PMC9854441.

Stage all'estero

Durante il terzo anno di Dottorato, ho avuto modo di trascorrere due mesi presso l'Università di Berna, nel gruppo di ricerca del Prof. Andrea Endimiani. Fra le varie attività svolte, ho potuto approfondire le mie conoscenze in merito alle metodiche di *Whole Genome Sequencing*. Nello specifico, le metodiche con le quali ho lavorato sono state l'estrazione del DNA genomico e le conseguenti analisi per la sua quantificazione, con Nanodrop e Qubit; il sequenziamento con Nanopore e, inoltre, ho potuto effettuare l'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, ho lavorato con numerosi software che permettono di effettuare sia l'*assembly* delle *short reads* che l'*hybrid assembly*, in caso di utilizzo di *short* e *long reads*; ciò mi ha permesso di conoscere e utilizzare i vari software necessari per studiare le sequenze genomiche ottenute lavorato

Successivamente, ho trascorso 4 mesi presso l'Istituto di Tecnologia, Chimica e Biologia (ITQB) dell'Università di Lisbona, nel laboratorio della Prof.ssa de Lencastre e della Dott.ssa Conceicao. In questo periodo ho avuto modo di apprendere nuove metodiche di analisi fenotipica dei ceppi batterici. Il progetto, mirato a determinare le caratteristiche fenotipiche e genotipiche di *Enterococcus faecium*, è stato svolto su 44 campioni, il 63.6% dei quali resistenti alla vancomicina (VRE) e il 36.4% sensibili a tale antibiotico (VSE). La presenza di geni coinvolti nella non-suscettibilità ai biocidi e di quelli che mediano la formazione di biofilm è stata determinata analizzando le sequenze genomiche dei ceppi usando MyDBFinder. In tutti i ceppi è stata riscontrata la presenza di *efmA*, mentre *TetI* e *TetU* erano presenti nel 45% e nel 4.5% dei campioni, rispettivamente; *acm* e *fsm2* sono stati identificati nel 95% dei campioni, mentre nel 29.5% di essi era presente il gene *ecbA*. Dal punto di vista fenotipico, la capacità di formazione di biofilm è stata valutata con un saggio specifico, che prevede la tintura con cristalvioletto e la successiva misurazione della torbidità; il 41% dei ceppi sono risultati produttori di biofilm. Successivamente, ho determinato la minima concentrazione inibente (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC) per 4 biocidi: clorexidina digluconato, cloruro di benzalconio, octenidina e perossido di idrogeno. La maggior parte dei ceppi testati sono risultati suscettibili a tali biocidi, mentre per 4 ceppi sono stati riscontrati dei valori di MIC e MBC più elevati; dunque, su tali ceppi sono stati condotti ulteriori saggi al fine di valutare sia la capacità di formazione di biofilm che quella di eradicazione dello stesso in presenza di clorexidina e cloruro di benzalconio, infine è stata valutata l'attività delle pompe di efflusso. Le analisi condotte hanno permesso di determinare che in presenza di

biofilm i valori di MIC aumentano, passando da 8 $\mu\text{g/ml}$ a 16 $\mu\text{g/ml}$; mentre non è stata riscontrata attività delle pompe di efflusso tale da determinare una riduzione apprezzabile della MIC per i biocidi testati.

Ringraziamenti

Al termine di questo ricco e intenso percorso vorrei esprimere la mia profonda gratitudine verso la Prof.ssa Deriu ed il Prof. Piana, per avermi permesso di entrare in questo mondo e per avermi guidata. Ricordo bene il giorno in cui ho iniziato e le parole che mi avete detto e che, durante questi anni, mi sono spesso tornate in mente. Farò tesoro di questa esperienza, di tutto ciò che mi ha permesso di apprendere e di fare.

Ringrazio le persone con cui ho condiviso le mie giornate, perché ognuna di voi mi ha arricchita, non solo sul lato professionale ma anche, e soprattutto, su quello personale: grazie per le esperienze che abbiamo condiviso, le porterò nei miei ricordi, per i consigli e per tutto il supporto (tecnico ma molto spesso psicologico!) che non avete mai mancato di darmi.

Un grazie alla mia famiglia: agli zii, le zie e ai miei cugini che sono sempre al mio fianco. Una menzione particolare devo farla per zia Rosina e Nicolina, perché nel periodo per me più difficile sono state fondamentali.

Desidero ringraziare mia madre e mia sorella, per tutto e sopra ogni cosa per la pazienza: ogni passo che faccio lo devo al vostro sostegno. Anche quando per me sembra impossibile, ci siete voi che mi permettete di andare avanti. E infine il mio pensiero più grande va a babbo e Aure, che c'erano quando stavo iniziando e che ora continuano ad accompagnarmi, seppur in un'altra forma. Ogni traguardo è per voi.