

Studi di antibiotico resistenza in regione FVG.

Giovedì 4 settembre 2025 ore 10:00

Antonella Felice, Sebastiano Muscia, Chiara Suraci – ARPA FVG



REALIZZATO DA:



Scuola per l'Ambiente di ARPA FVG

Studi di antibiotico resistenza in regione FVG

giovedì 4 settembre 2025

Antonella Felice, Sebastiano Muscia, Chiara Suraci – ARPAFVG

Premessa:

Dal 2024 il **Laboratorio di Alimenti e Microbiologia di Udine ARPAFVG** in conformità con quanto indicato nella nuova Direttiva Europea 2024/3019 (pag 10 punto 35) concernente il trattamento delle acque reflue urbane e nelle acque superficiali e con il PNCAR 2022-2025 ha avviato uno studio per la ricerca di ***E.coli* ESBL (Extended spectrum beta lactamase) e geni di AMR nei reflui urbani** utilizzando tecniche colturali e di biologia molecolare (RT PCR Multiplex, Sequenziamento NGS).

La resistenza antimicrobica (AMR) è uno dei principali problemi di salute pubblica del XXI secolo.

Negli ultimi decenni, organismi internazionali, quali l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) hanno prodotto raccomandazioni e proposto strategie e azioni coordinate atte a contenere il fenomeno, riconoscendo l'AMR come una priorità in un ambito sanitario.

❖ Parte 1:

- Introduzione
- Gli antibiotici
- Definizione di antibiotico resistenza e meccanismi
- PNCAR – Piano Nazionale di contrasto all'Antibiotico Resistenza
- EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- Attività del Laboratorio di Udine ARPA FVG : Ricerca di geni di AMR nei reflui urbani domestici (PCR RT Multiplex)

❖ Parte 2:

- Attività del Laboratorio di Udine ARPA FVG : Sequenziamento geni AMR

❖ Parte 3:

- Attività del Laboratorio per lo studio degli ecosistemi acquatici (TS)

Gli antibiotici:

sono agenti antimicrobici che hanno capacità di uccidere i batteri o inibirne la crescita, agendo su processi fondamentali per lo sviluppo e la sopravvivenza delle cellule (Madigan et al., 2012).

Il primo antibiotico fu scoperto nel 1910, in più di 100 anni gli antibiotici hanno cambiato drasticamente la medicina moderna e prolungato la vita umana.

La scoperta della penicillina è avvenuta nel 1928, dando inizio agli anni d'oro degli antibiotici di produzione naturale. Dalla metà degli anni 50, c'è stato un graduale declino delle scoperte e l'osservazione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza in molti patogeni fino all'attuale crisi sanitaria (Hutchings et al., 2019).



Classificazione degli antibiotici:

Esistono diversi sistemi per la classificazione degli antibiotici:

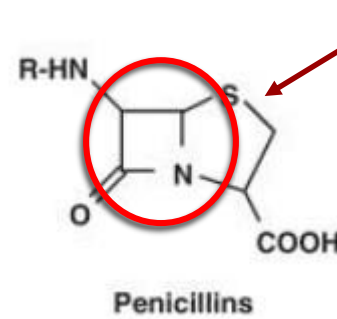
- Classificazione in famiglie – molecole che presentano caratteristiche simili (es: penicilline, cefalosporine);
- Classificazione secondo lo spettro di azione (ventaglio delle specie su cui l'antibiotico mostra attività: ampio, medio, ristretto)
- Classificazione secondo il tipo di azione: batteriostatica, battericida
- Classificazione secondo l'origine: estrattiva, semisintetica, sintesi chimica
- Classificazione secondo la carica elettrica : antibiotici a carattere acido (come anioni), carattere basico (come cationi), carattere neutro (molecole non ionizzate)
- Classificazione in base al meccanismo di azione

- **Classificazione in famiglie** – molecole che presentano caratteristiche simili (es: penicilline, cefalosporine):
 - β -lattamici: comprendono le penicilline, cefalosporine e carbapenemi. Le accomuna la presenza di un caratteristico anello β -lattamico. Agiscono inibendo l'ultimo step della sintesi del peptidoglicano (Eyler & Shvets, 2019);
 - Aminoglicosidici:
 - Sulfamidici:
 - Lipopeptidi:
 - Chinoloni e fluorochinoloni:
 - Macrolidi:
 - Tetracicline:
 - Glicilcicline:
 - Rifampicina:
 - Glicopeptidi: classe di antibiotici usata per trattare infezioni batteriche gravi soprattutto causate da G+ resistenti ad altri antibiotici. Usati in ambito ospedaliero (Vancomicina).
 - Lincosamidi:
 - Ossazolidinoni:

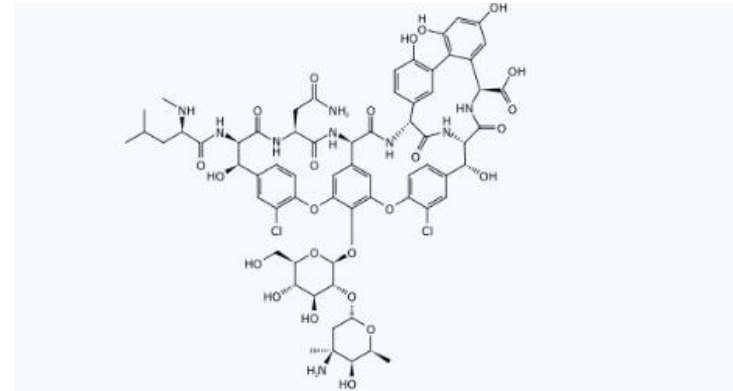
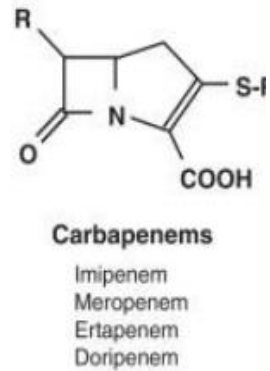
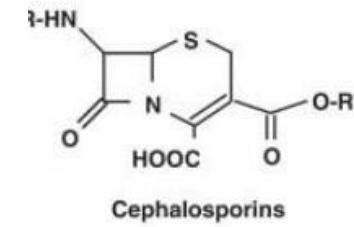
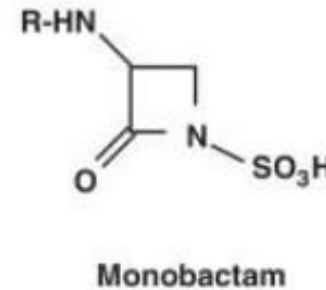
Geni di AMR sono i più diffusi

Famiglie di antibiotici oggetto dello studio :

- **β -lattamici:** comprendono le penicilline, cefalosporine e carbapenemi. Le accomuna la presenza di un **caratteristico anello β -lattamico**. Agiscono inibendo l'ultimo step della sintesi del peptidoglicano (Eyler & Shvets, 2019);
- carbapenemi: (Imipenem, Meropenem) betalattamici ad ampio spettro aventi come meccanismo di azione l'inibizione della sintesi del peptidoglicano;
- cefalosporine: (Cefatoxime) betalattamici ad ampio spettro aventi come meccanismo di azione l'inibizione della sintesi del peptidoglicano.
- **Glicopeptidi:** classe di antibiotici usata per trattare infezioni batteriche gravi soprattutto causate da G+ resistenti ad altri antibiotici, caratterizzati da un **carboidrato legato ad un peptide** (vancomicina).



β -lattame è un anello a 4 atomi che forma un'amide ciclica (lattame), che costituisce il nucleo funzionale principale della classe di antibiotici detti β -lattamici.



Le contaminazioni prevalenti sono :

- **l'ambiente acquatico (in particolare i reflui e acquacoltura);**
- **la pedosfera** (fanghi di depurazione usati come ammendanti e errato trattamento dei rifiuti speciali).

E' stato riscontrato che una volta diffusi nell'ambiente possono generare **effetti ecotossicologici su organismi vegetali e animali** (influenzano la fotosintesi e ritardano la germinazione), Direttiva UE 2013/39 istituisce le watch list anche per gli ambienti acquatici.

Non sono ben noti i processi di degradazione in ambiente dipendono da vari fattori di reazione (ad esempio molti beta lattamici tendono a idrolizzare quindi a degradare ma ciò non toglie che il gene possa permanere nel tempo).



Polianciuc, S. et al. (2020). Antibiotics in the environment: Causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(3), 231–240.
<https://doi.org/10.15386/mpr-1742>

Barathe, P., et al. (2024). Antibiotic pollution and associated antimicrobial resistance in the environment. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 5, 100105. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2024.100105>

de Ilurdoz, et al. (2022). Antibiotic removal processes from water & wastewater for the protection of the aquatic environment—A review. *Journal of Water Process Engineering*, 45, 102474. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102474>

Definizione di antibiotico resistenza

La resistenza agli antibiotici, o antibiotico-resistenza, è un fenomeno di adattamento grazie al quale alcuni microrganismi acquisiscono la capacità di sopravvivere o di svilupparsi in presenza di una concentrazione di antibiotico che generalmente sarebbe sufficiente a uccidere o inibire microrganismi della stessa specie.

Tale resistenza può essere intrinseca nel caso in cui sia dovuta alla natura stessa del microrganismo o acquisita se il microrganismo in precedenza sensibile risulta resistente in tempi successivi (Courvalin, 2008).



Un batterio può acquisire geni codificanti meccanismi di antibiotico-resistenza da altri microrganismi oppure subire delle mutazioni durante le fasi di replicazione. (ECDC/EMA, 2009).

Antibiotico resistenza

Negli ultimi anni, il fenomeno **dell'antibiotico-resistenza** (AMR, *Antimicrobial resistance*) è aumentato notevolmente.

Il problema della resistenza agli antibiotici è complesso poiché riconosce diverse cause:

- l'aumentato uso di questi farmaci (incluso l'utilizzo non appropriato) sia in medicina umana che veterinaria
- l'uso degli antibiotici in zootecnia e in agricoltura

L'AMR oggi è uno dei principali problemi di sanità pubblica a livello mondiale con importanti implicazioni sia dal punto di vista clinico (aumento della morbidità, della mortalità, dei giorni di ricovero, possibilità di sviluppo di complicanze, possibilità di epidemie), sia in termini di ricaduta economica per il costo aggiuntivo richiesto per l'impiego di farmaci e di procedure più onerose, per l'allungamento delle degenze in ospedale e per eventuali invalidità.

Meccanismi di acquisizione antibiotico resistenza:

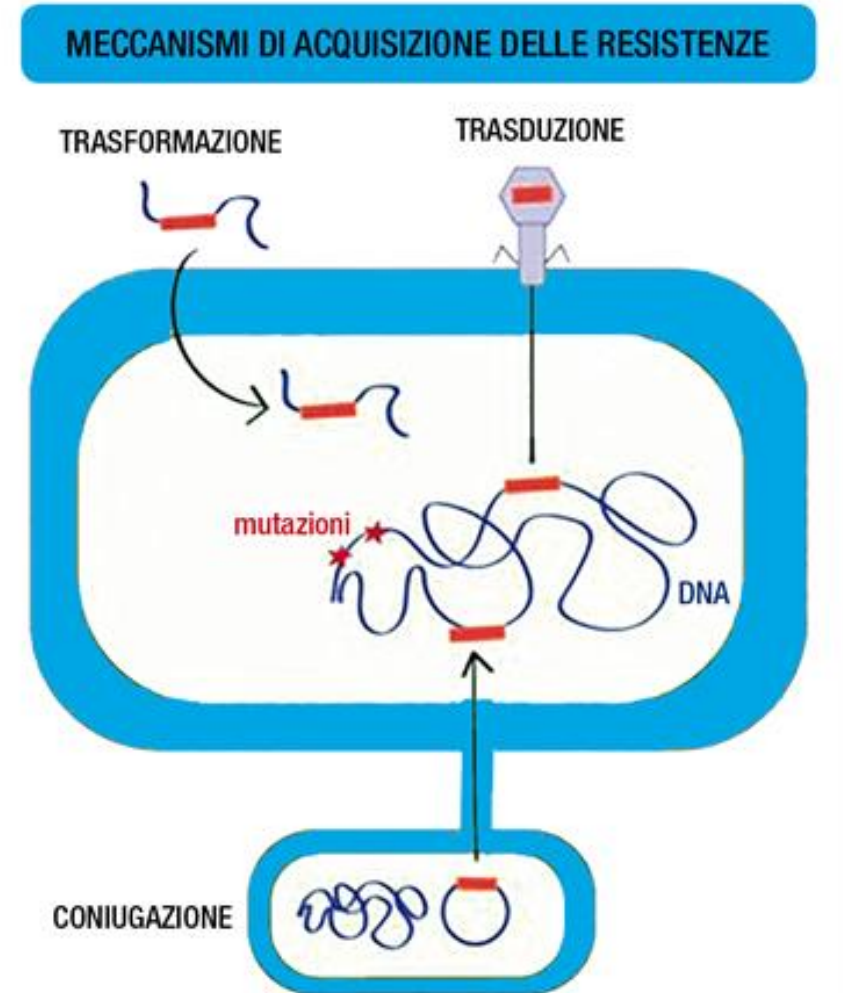
- Per acquisizione di DNA estraneo
- Mutazioni genetiche

Meccanismi di acquisizione di DNA dall'ambiente estraneo:

- Trasformazione (incorporazione DNA nudo)
- Trasduzione (tramite fagi)
- Coniugazione (contatto cellula-cellula)
(trasferimento orizzontale)

Una volta acquisito il gene questo viene trasmesso tramite la duplicazione cellulare (trasmissione verticale)

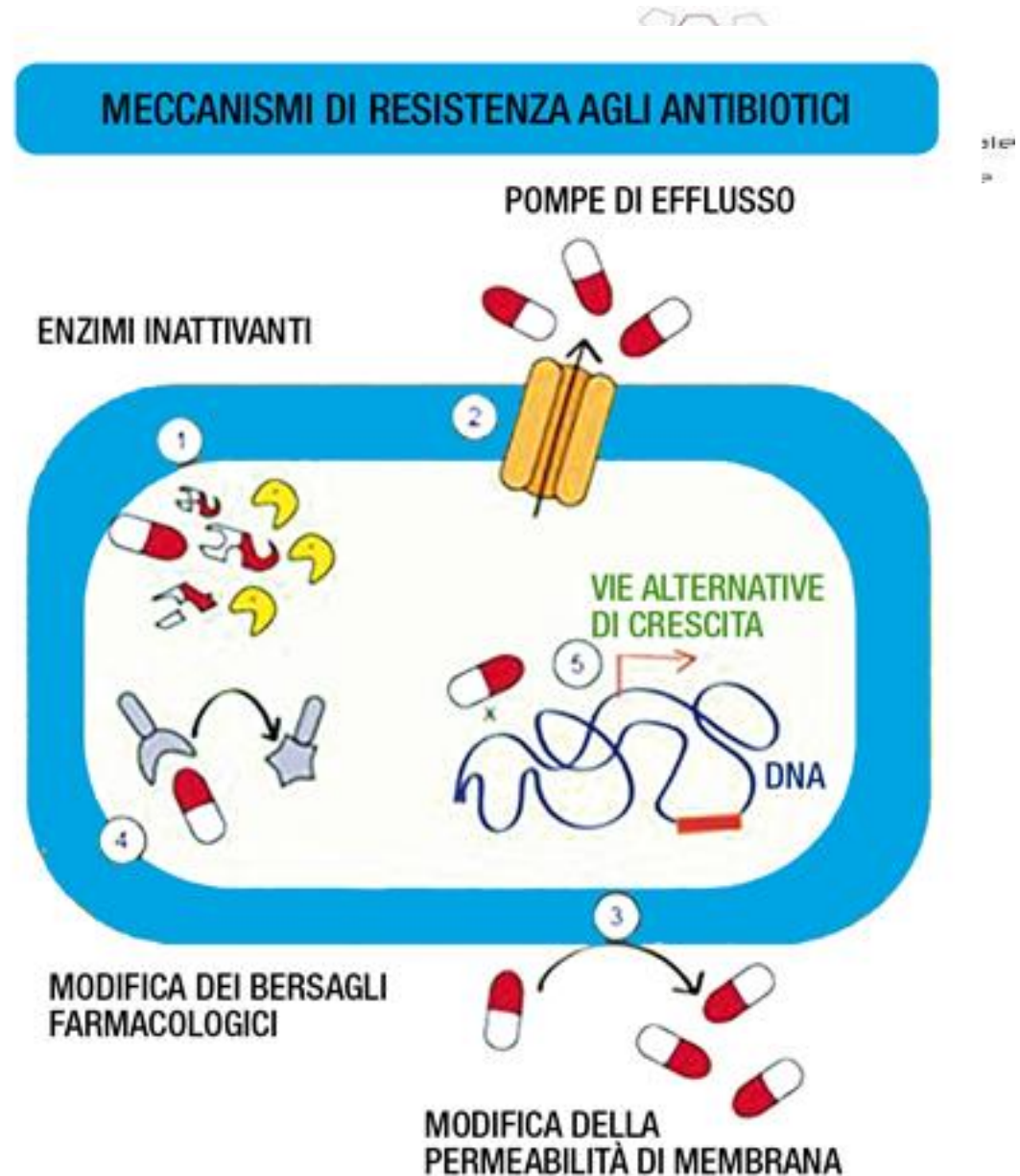
La maggior parte degli agenti antimicrobici usati nella pratica clinica sono sostanze che si trovano in natura prodotti da microrganismi. I batteri che secernono queste sostanze presentano determinanti genetici intrinseci di resistenza (Madigan et altri., 2012)



Meccanismi di resistenza agli antibiotici

I batteri AMR:

- modifica della permeabilità della membrana cellulare ciò rende difficoltosa l'azione dell'antibiotico;
- producono enzimi inattivanti che distruggono l'antibiotico (rottura/idrolisi dei legami chimici);
- modifica dei bersagli dell'antibiotico: modifica delle subunità ribosomiali impedendo il legame tra l'antibiotico e il suo target;
- vie alternative di crescita: mutazioni.



Determinazione della sensibilità di un microrganismo agli antibiotici : AST (Antimicrobial susceptibility testing)



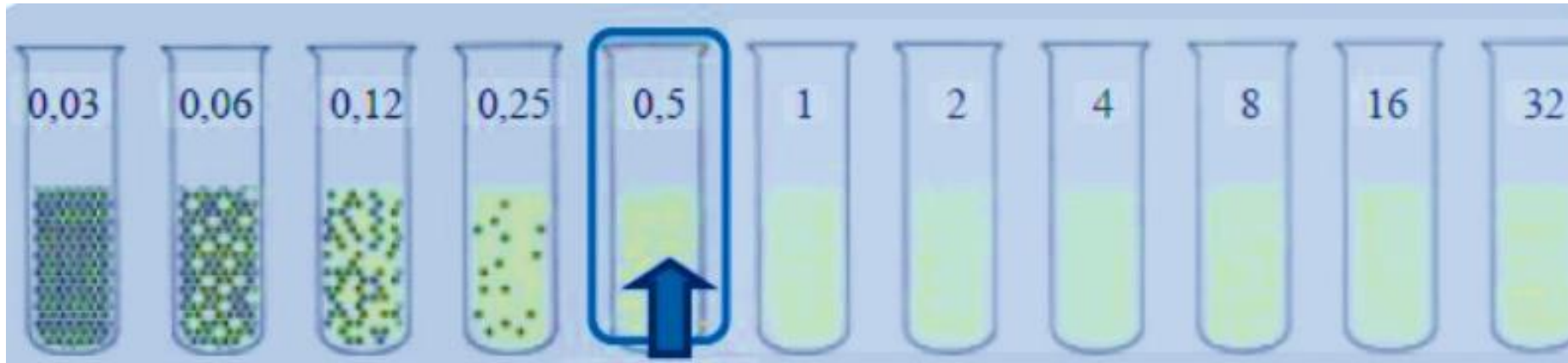
Comitato europeo (istituito nel 1997 ESCMID e ECDC): si occupa di definire i valori di *breakpoint* per i batteri. Il breakpoint (valore soglia) antibiotico è un valore di riferimento espresso in termini di :

- **MIC (ug/l)** – Concentrazione minima inibente
- **Diametro (mm)** di alone di inibizione

Confrontando i valori di MIC o Diametro di inibizione con quelli riportati da EUCAST è possibile classificare un batterio come:

- Sensibile: il batterio **è inibito** da concentrazioni di antibiotico usate nei trattamenti standard
- Intermedio:
- Resistente: il batterio **NON è inibito** da concentrazioni di antibiotico usate nei trattamenti standard

https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

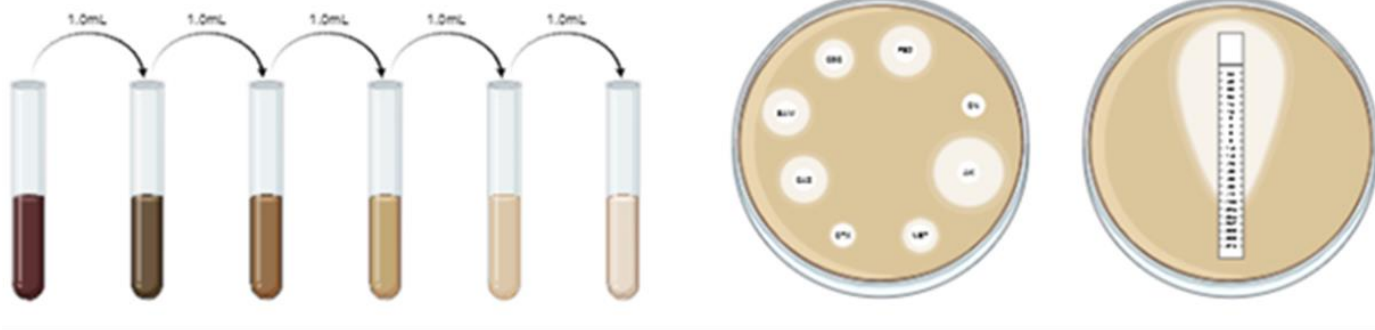


MIC

Metodo delle diluizioni in brodo:

Provette con terreno di coltura liquido a concentrazioni note di antibiotico vengono inoculate con il ceppo batterico da testare. Incubazione. Lettura: la MIC corrisponde al primo tubo in cui la crescita risulta inibita.

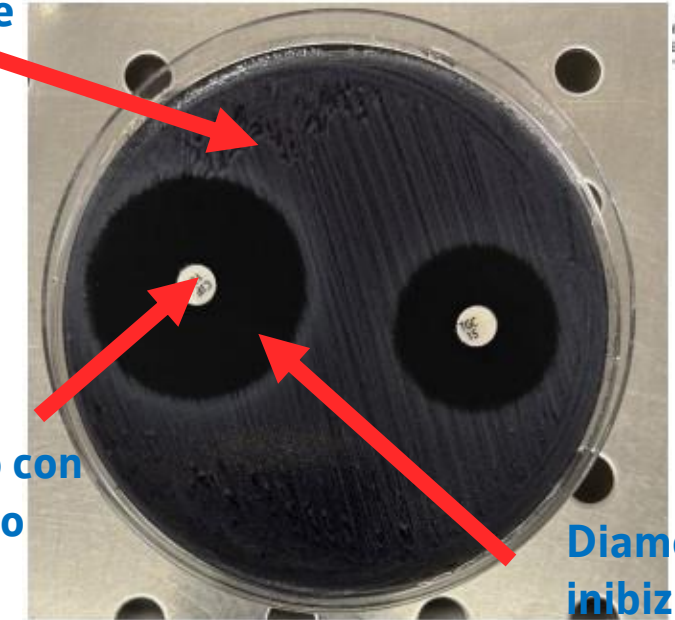
Test Kirby- Bauer



Semina
sospensione
batterica

Dischetto con
antibiotico

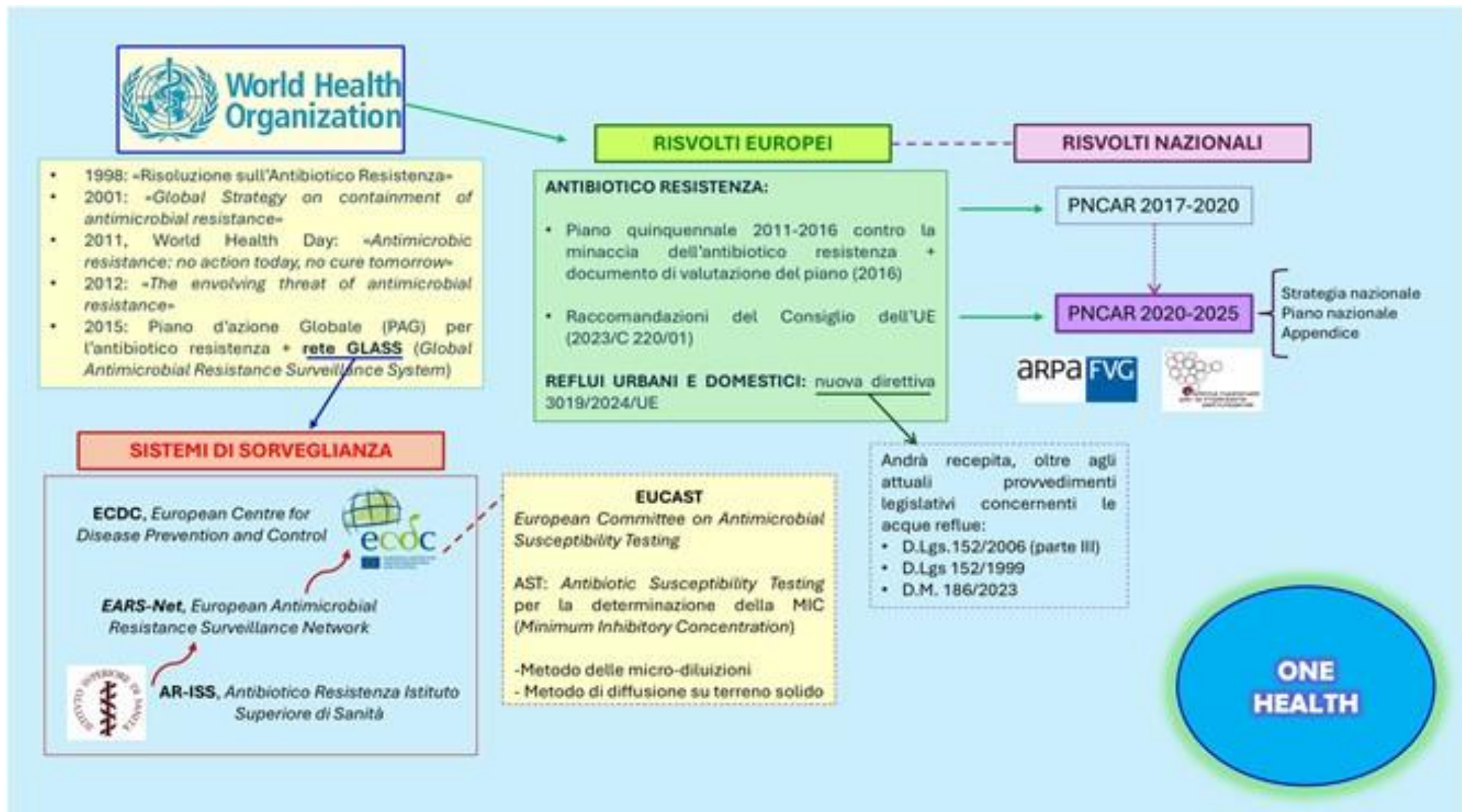
Diametro di
inibizione



Esempio di test Kirby-Bauer: *Legionella pneumophila*.

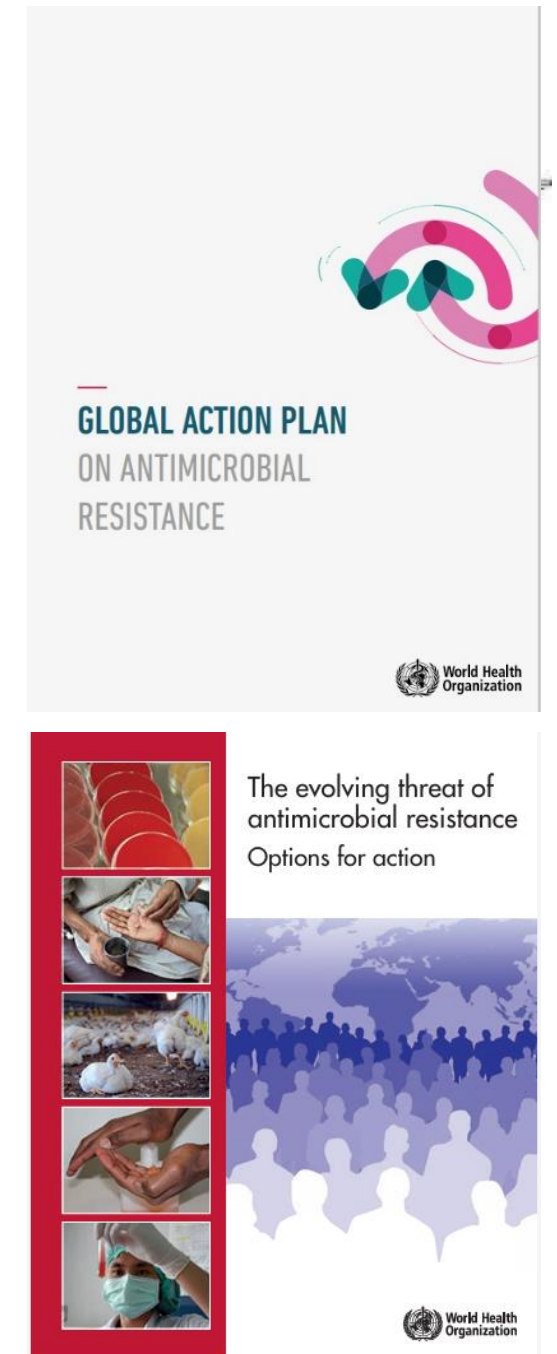
Metodo di diffusione in agar (Test di Kirby- Bauer e E test). Metodo usato nella routine anche se più antico.

Su piastre di terreno solido viene inoculata una sospensione batterica a concentrazione nota del microorganismo da testare . Sulla piastra viene posto un dischetto contenente l'antibiotico che a contatto con la superficie umida dell'agar assorbe acqua e rilascia antibiotico che diffonde nel terreno circostante. Incubazione delle piastre. Lettura: misura del diametro di inibizione



Antibiotico resistenza:

- WHO 1998 - Resolution on antimicrobial resistance
- WHO 2001 - The WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance
- WHO 2011 - On World Health Day 2011, WHO again highlighted AMR
- WHO 2012 - The evolving threat of antimicrobial resistance Options for action
- WHO 2015 – Global Action Plan on Antimicrobial Resistance
- WHO 2021- Integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One Health” approach: Implementation and opportunities
- Ministero della Salute 2017 – Intesa Governo Regioni sul documento PNCAR 2017-2020
- PNCAR 2017 - Ministero della Salute
- PNCAR 2022-2025 – Ministero della Salute



Sistemi di sorveglianza: ISS (AR-ISS) –GLASS (ECDC – WHO)

- Dal 2001 ISS (AR-ISS) coordina una rete di laboratori ospedalieri che forniscono dati per determinati patogeni (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter*).
- I dati vengono trasmessi a EARS- Net coordinato da ECDC, facente parte della rete GLASS (Global antimicrobial resistance surveillance system – WHO)

➔ <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/resistenza>



PNCAR – Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico- Resistenza 2022-2025 affronta il problema dell'AMR mediante visione *One Health* –un approccio integrato, unificato che mira alla sostenibilità e alla salute umana, animale e degli ecosistemi; riconosce come il benessere umano, di animali domestici e selvatici, piante e dell'intero pianeta siano legati indissolubilmente.



Struttura del PNCAR

Si articola in tre parti:

- Strategia nazionale: Formazione Informazione, ricerca e innovazione e cooperazione nazionale e internazionale
- Piano nazionale : indica per ogni area gli obiettivi specifici
- Appendice : dedicata all'AMR in funghi, parassiti e virus



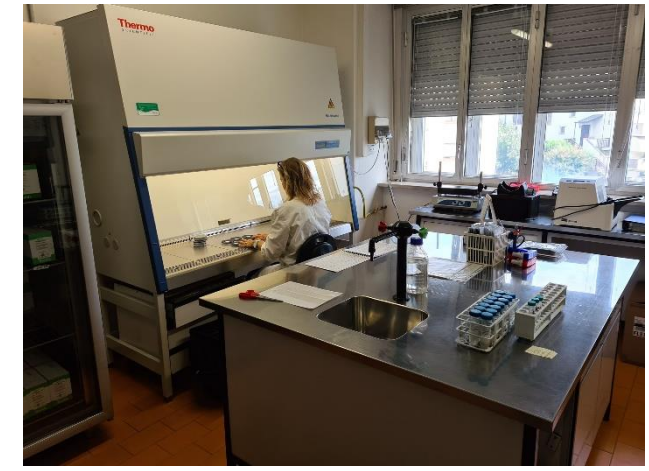
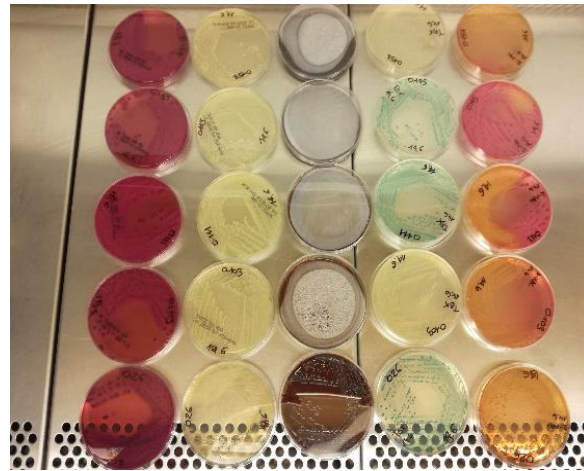
Ruolo di ARPA e PNCAR:

- Strategia nazionale per il contrasto dell'AMR 2022-2025 tra i soggetti tra prevede la collaborazione di ARPA
- Capitolo «Monitoraggio ambientale degli antibiotici e AMR si sottolinea il ruolo dell'ambiente nella disseminazione di geni AMR in particolare in siti quali gli ambienti acquatici e gli impianti di trattamento reflui. Si evidenzia inoltre l'importanza del monitoraggio per la ricerca di antibiotici e di geni di resistenza

Anche l'acqua risulta essere una delle principali vie di diffusione dei batteri resistenti, che negli impianti di depurazione trovano l'ambiente adatto e alla loro proliferazione; infatti, vengono rilasciate grandi quantità di antibiotici nelle acque reflue a causa del loro metabolismo incompleto negli esseri umani o per il loro smaltimento scorretto (Prestinaci et al., 2015).



Attività del Laboratorio di ARPA FVG



Attività del Laboratorio di ARPA FVG:

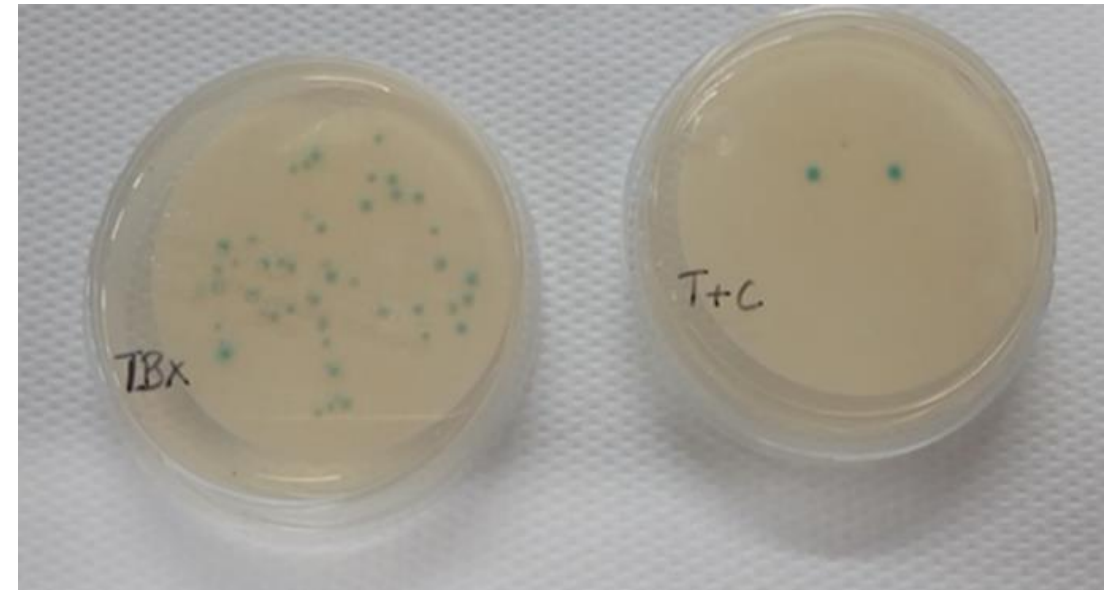
Dal 2024 il Laboratorio di ARPAFVG ha avviato uno studio su campioni di acque reflue urbane in ingresso e in uscita dagli impianti di depurazione e nelle acque superficiali per la ricerca di:

- Batteri AMR
- Geni AMR

Il Laboratorio nell'approccio al problema ha individuato diversi metodi analitici disponibili in commercio.

1) METODO CULTURALE: Ricerca e conteggio di batteri AMR - *E.coli* ESBL resistenti in acque reflue

- Conteggio di *Escherichia coli* e *Escherichia coli* ESBL in acque reflue mediante metodo colturale - protocollo OMS;
- Conferma fenotipica sulle colonie individuate come resistenti agli antibiotici – Test di Kirby Bauer;
- Identificazione batterica delle colonie individuate come resistenti mediante spettrometria di massa -tecnica MALDI-TOF;



2) METODO BIOLOGIA MOLECOLARE: ricerca di geni AMR in acque reflue

- Ricerca di **geni di antibiotico resistenza** nelle acque reflue con metodi di biologia molecolare - RT PCR Multiplex ;
- Ricerca di geni di antibiotico resistenza da colonia batterica isolata su terreni contenenti antibiotici metodi di biologia molecolare (metodo classico mediante RT PCR Multiplex);
- Ricerca di **geni AMR con sequenziamento NGS**



Termociclature



Sequenziatore

METODO CULTURALE

Conteggio di *Escherichia coli* e *Escherichia coli* ESBL in acque reflue mediante metodo colturale - protocollo OMS;

DEFINIZIONI:

- ***Escherichia coli***: bastoncelli Gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi del genere *Escherichia*. Molto diffusi nell'ambiente, componente naturale del microbiota intestinale umano e animale.
- ***Escherichia coli* ESBL** *E.coli* produttori di betalattamasi a spettro esteso).

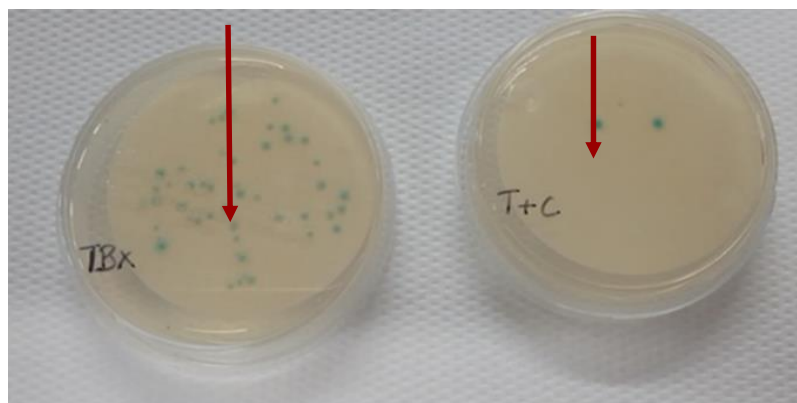
Ceppi di *E.coli* AMR produttori di enzimi chiamati *betalattamasi* a spettro esteso. Questi enzimi rendono i ceppi *E.coli* resistenti agli antibiotici betalattamici perché sono in grado idrolizzare gli antibiotici betalattamici (penicillina, carbapenemi, cefalosporine)



PROCEDIMENTO METODO CULTURALE:



1) Filtrazione di **due** aliquote di campione (metodo delle membrane filtranti): membrane sterili in esteri di cellulosa porosità 0,45 µm.



2) Semina e incubazione per 24h a 44°C.

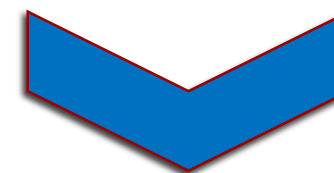
Terreni colturali selettivi:

- **TBX** → *E. coli*
- **TBX + cefotaxime** (betalattamico) → *E. coli* ESBLs

Risultato: UFC (volume filtrato)



Conferma *E.coli* ESBL:



Test di Kirby Bauer (metodo di diffusione in agar)



RT PCR Multiplex:
rilevazione di geni



MALDI TOF (Matrix-Assisted
Laser Desorption/Ionization
Time-of-Flight)

TECNICA CHIMICA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA (MALDI-TOF) per la conferma di batteri AMR

La tecnologia di ionizzazione **MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)** si basa sull'eccitazione delle molecole del campione con un raggio laser per produrne la vaporizzazione e la ionizzazione.

Una matrice genera la vaporizzazione e ionizzazione delle proteine.

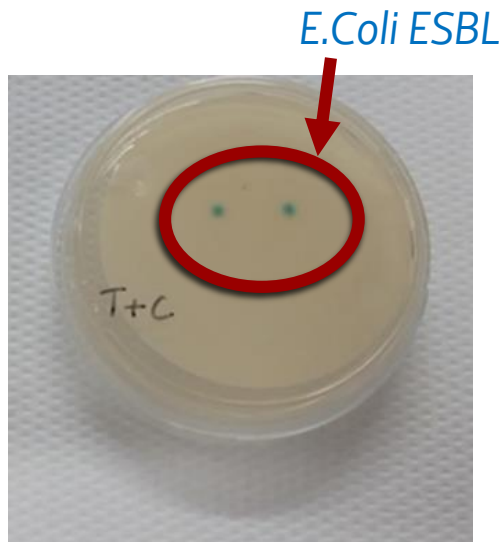
Le proteine ionizzate passano attraverso un tubo di volo e giungono a un rilevatore.

Il segnale rilevato genera uno spettro di massa caratteristico di ciascuna specie batterica.

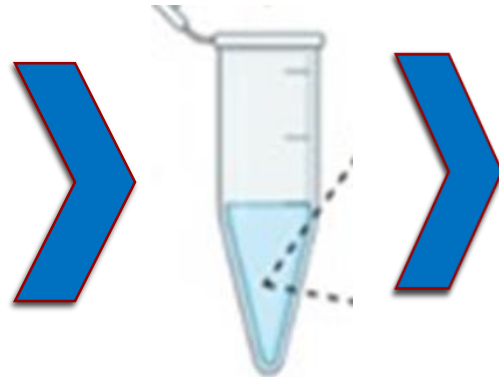


Maldi-TOF: consente un'analisi delle attività della β -lattamasi nei batteri grazie al Software MBT Star-BL - kit MBT STAR-Cefa

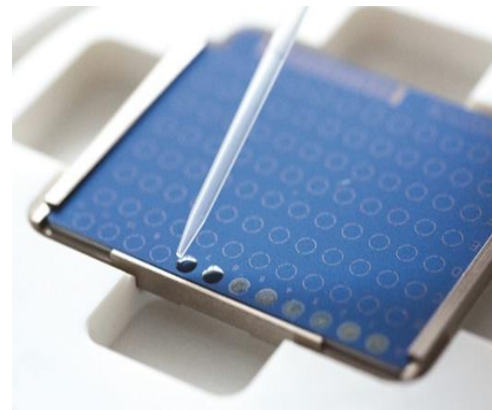
- Kit CEFA:** incubazione di batteri produttori di enzima beta lattamasi con il reagente antibiotico provoca la scissione (idrolisi) dell'anello β -lattamico dell'antibiotico, convertendo quindi l'antibiotico in un inattivo metabolita. Post incubazione l'azione o meno dell'antibiotico viene monitorata rilevando uno specifico picco .



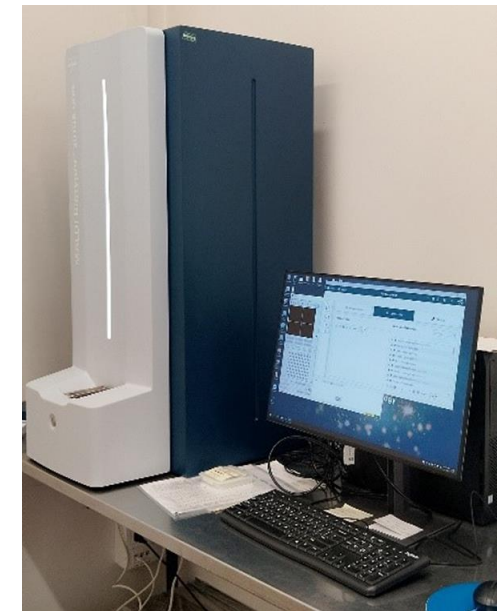
Colonie da
confermare



Incubazione della
colonia con antibiotico



Preparazione della piastra
di reazione: colonia con
matrice



Generazione dei picchi specifici e
lettura del software

Lettura dei risultati:

- **Sample 1 e 2 *Escherichia coli*** idrolizzano l'antibiotico (perde la sua capacità) - Batteri AMR
- **Sample 3 NON idrolizza** l'antibiotico quindi *Klebsiella variicola* NON AMR

Se il batterio idrolizza l'antibiotico lo inattiva perciò è batterio AMR

Sample	Species	Control ID	Cepha	
Sample 1	<i>Escherichia coli</i>	confirmed	1.28	H
Sample 2	<i>Escherichia coli</i>	confirmed	1.14	H
Sample 3	<i>Klebsiella variicola</i>	confirmed	-0.55	NH
neg.control		not performed	-0.10	NH
pos.control		not performed	1.04	H
Δ_{controls}			1.12	

H	Hydrolyzed ¹
NH	Non-hydrolyzed ²

Figure 2 : Result report allowing easy and objective interpretation of the detection of cephalosporinase activity

¹ cephalosporinase activity detected; ² no cephalosporinase activity detected

TECNICA RT-PCR Multiplex per la ricerca di geni AMR

Geni AMR oggetto dello studio: 8 geni Target

- *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaOXA-48*
- CTXM – M
- VAN A , VAN B



Hanno la capacità di conferire ai batteri antibiotico resistenza agli antibiotici betalattamici:

- KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48 agli antibiotici carbapenemi.
- CTX-M agli antibiotici cefalosporine, penicillina, carbapenemi

Hanno la capacità di conferire ai batteri antibiotico resistenza agli antibiotici glicopeptidi

Scelta dei geni target:

- ✓ Interesse verso la resistenza agli antibiotici betalattamici sono molto usati e ad ampio spettro di azione
- ✓ Secondo quanto descritto in letteratura questi geni sono molto diffusi
- ✓ Disponibilità di kit commerciali di amplificazioni dato che al momento non sono definiti protocolli per la scelta
- ✓ Coerentemente alla ricerca di *E.coli* ESBL

blaKPC : acronimo di *Klebsiella pneumonia carbapenemasi*, conferisce resistenza ai carbapenemi, rappresentando un grave problema per la salute, vista la sua facile diffusione in strutture ospedaliere, anche a livello intercontinentale. La sua diffusione riguarda anche altri batteri gram-negativi, oltre a *K. pneumoniae* (Arnold et al, 2011).

blaOXA-48 : isolato per la prima volta nel 2001 in Turchia in *K. pneumoniae*, anche questo gene conferisce resistenza ai β -lattamici, in particolare ai carbapenemi. Inoltre, le sequenze OXA-48 sono spesso localizzate su plasmidi, che ne facilitano la diffusione anche in contesti comunitari. Alcuni gram-negativi interessati da OXA-48 sono *E. coli*, *K. pneumoniae* e *oxytoca*, *Acinetobacter baumannii* (Gurung et al, 2020).

blaNDM : NDM codifica per l'enzima *New Delhi metallo- β -lattamasi* (MBL), in grado di idrolizzare molti antibiotici β -lattamici (Zhang et al, 2021). Isolato per la prima volta in *K. pneumoniae* a Nuova Delhi nel 2008 (Yong et al, 2009), ad oggi risulta il terzo gene codificante per carbapenemasi più diffuso, dopo KPC ed OXA-48 (Karlowsky et al, 2017).

blaCTX-M : ormai ampiamente diffuso a livello globale (Bevan et al, 2017), CTX-M ha probabilmente origine dal batterio rizosferico *Kluyvera ascorbata*, che possiede il gene blaKLUA, responsabile della resistenza alle cefalosporine ed estremamente simile alle sequenze di CTX-M: ciò suggerisce che il gene CTX-M abbia avuto origine da tale microrganismo (Zhao & Hu, 2013). Ad oggi, CTX-M è stato ritrovato in reflui urbani, acque marine e superficiali (Amos et al, 2014). Tale gene è responsabile delle resistenze ESBLs.

blaVIM : Verona integron-encoded metallo β -lactamase, isolato in Italia nel 1999, è presente per lo più in *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida*, piuttosto che in *Enterobacteriaceae*. È spesso associato a plasmidi e codifica per enzimi β -lattamasi, eccetto per la classe dei monobattami. Risulta particolarmente diffuso nell'Est asiatico [8].

blaIMP : il gene IMP, codificante per l'enzima imipenemasi, conferisce resistenza ai carbapenemi, in particolare Imipenem e Meropenem, e ai monobattami. Per la prima volta fu riportato in Giappone nel 1998 da *P. aeruginosa* e ad oggi è ampiamente diffuso in tutto il mondo. Non sono ancora note le specifiche sequenze codificanti le sue varianti genetiche (Pongchaikul & Mongkolsuk, 2022).

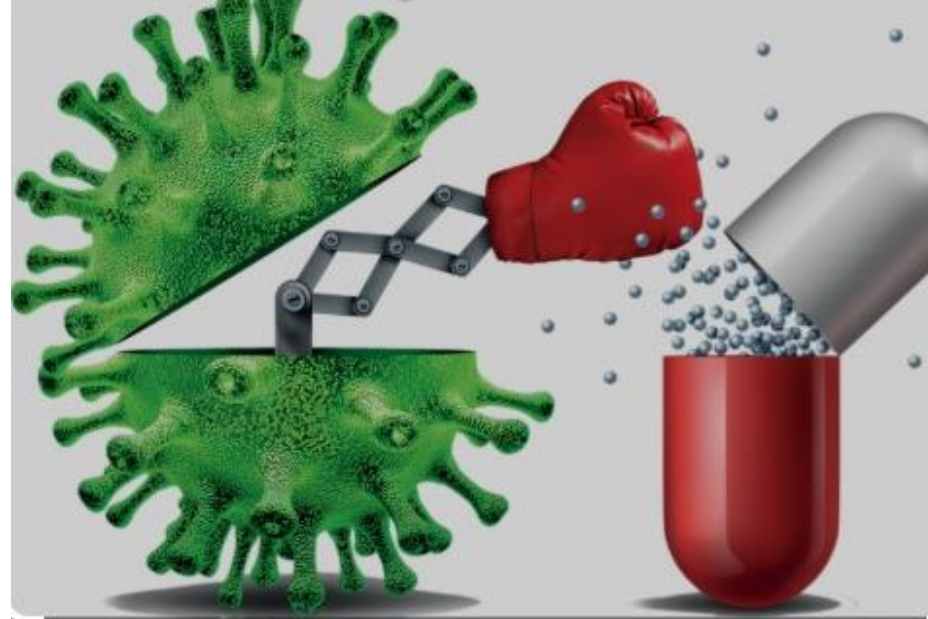
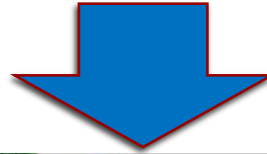
VanA e VanB : tali geni conferiscono resistenza a vancomicina e teicoplanina (glicopeptidi), in particolare per *Enterococchi* (si parla di VRE, *Vancomycin-Resistant Enterococci*), batteri gram-positivi presenti naturalmente nella flora intestinale e responsabili di alcune infezioni urinarie (Moosavian et al, 2018). Cong et al. (2019) riportano che *VanA* è stato inoltre isolato anche in *Staphylococcus aureus*, presente sulla cute e sulle membrane nasofaringee umane. Questi geni codificano per enzimi in grado di modificare la parte terminale della catena di peptidoglicano, impedendo all'antibiotico di legarsi efficacemente al substrato target (Halawa et al, 2024).

Principio del meccanismo di azione di resistenza ai betalattamici:

- *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOxa-48* e *blaIMP*
- CTX-M

Questi geni codificano per un enzima betalattamasi

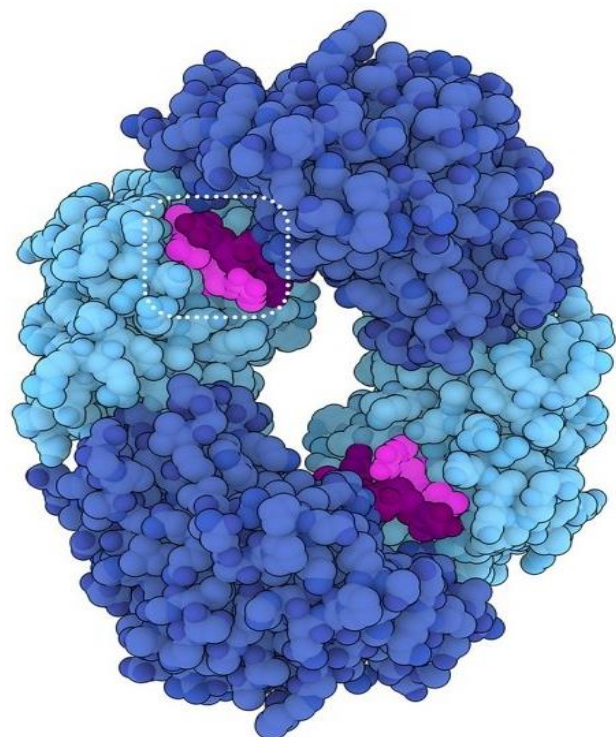
E.coli ESBL



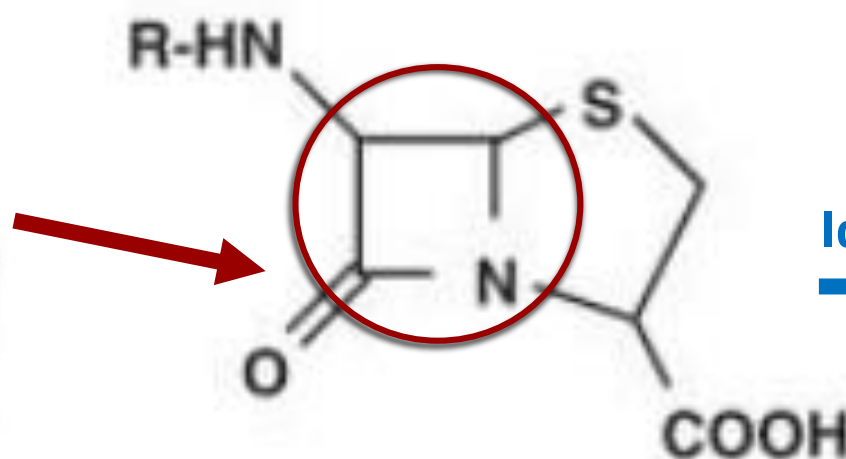
Gene ***blaKPC*** (carbapenemasi) codifica per l'enzima *betalattamasi* che ha la funzione di idrolizzare l'anello caratteristico dei betalattamici

Inattivazione dell' antibiotico carbapeneme a opera della carbapenemasi codificata da KPC

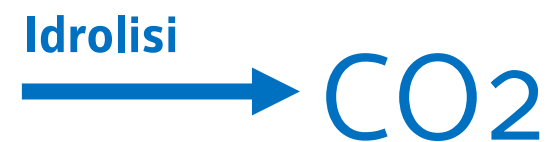
Meccanismo di azione degli enzimi betalattamasi



Esempio di betalattamasi

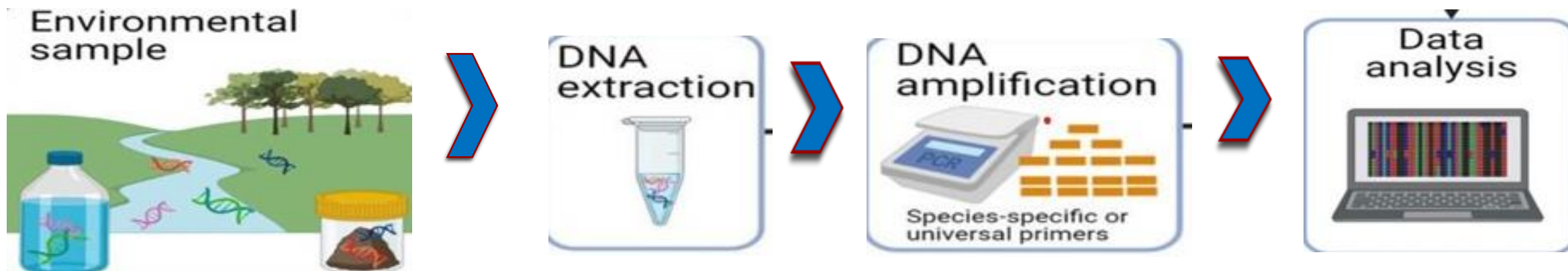


Penicillins



Lo studio per la ricerca di geni AMR tecnica della PCR Multiplex si articola nelle seguente fasi:

- **Fase di campionamento:** acque reflue urbane (campionamento medio composito 24h a cura dei servizi territoriali della SOC Pressioni di ARPAFVG)
- **Fase di Laboratorio :** analisi dei campioni
- **Elaborazione dei dati**





Nel periodo 2024-2025 sono stati analizzati circa 100 campioni di acqua di scarico provenienti da impianti di trattamento di acque reflue urbane:

- in uscita
- per questa campagna di ricerca di geni AMR ARPA FVG ha predisposto due campagne annuali con prelievo di campioni in ingresso e in uscita dall'impianto.

Campionamento:

- a cura dei servizi territoriali della SOC Pressioni di ARPAFVG;
- il campione, come previsto dalla normativa prevede un campionamento medio composito di 24 ore;
- il campione è contenuto in bottiglie di PP sterili da 500 ml senza tiosolfato e conservato a 4- 10°C;
- analisi microbiologiche devono essere eseguite nelle 24 h;
- analisi molecolari devono essere svolte entro le 48 ore o diversamente il campione deve essere congelato.

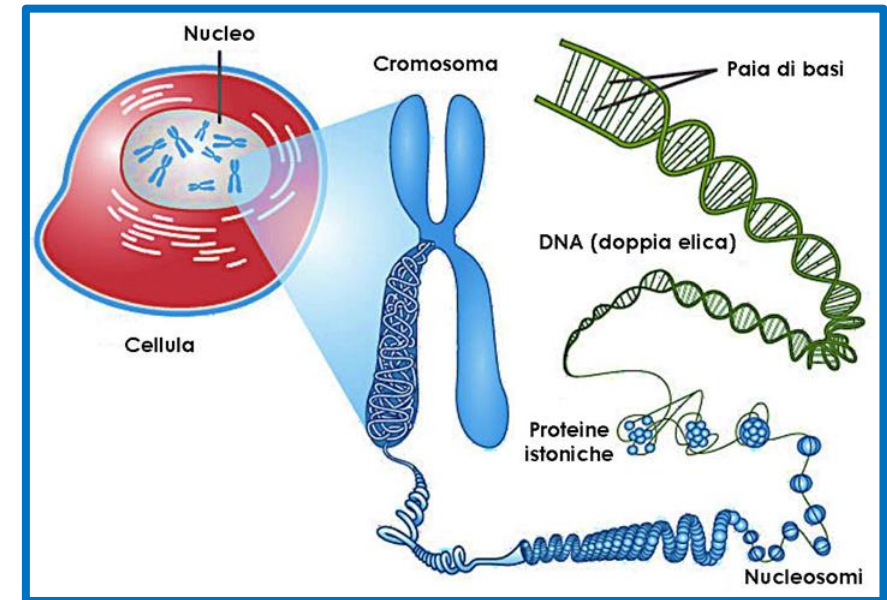


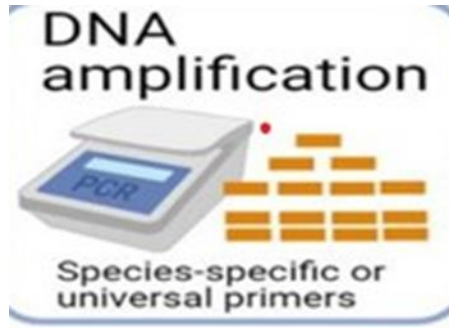


Estrazione del DNA:

consiste nella separazione e purificazione delle molecole di DNA da membrane, proteine ed altri componenti cellulari, tramite metodi fisici o chimici. Questo processo prevede 3 fasi principali:

- **Lisi cellulare:** distruzione delle membrane cellulari per via meccanica, chimica o enzimatica con rilascio di DNA e materiale intracellulare in soluzione;
- **Separazione degli acidi nucleici liberi** dal resto dell'estratto cellulare. Tale operazione prevede, in particolare, la digestione delle proteine presenti nel campione, grazie all'aggiunta di enzimi quali le proteinasi K;
- **Purificazione (lavaggio):** rimozione di resti cellulari e materiali indesiderati, purificando il DNA con isopropanolo o etanolo.
- Utilizzo di protocolli o kit commerciali (manuali o automatizzati)





PCR Polimerase chain reaction – reazione a catena della polimerasi (Kary Mullis, 1986)

Reazione di amplificazione in vitro che consente di ottenere molecole identiche di un segmento specifico di DNA target per mezzo di una DNA polimerasi (enzima che copia la sequenza nucleotidica).

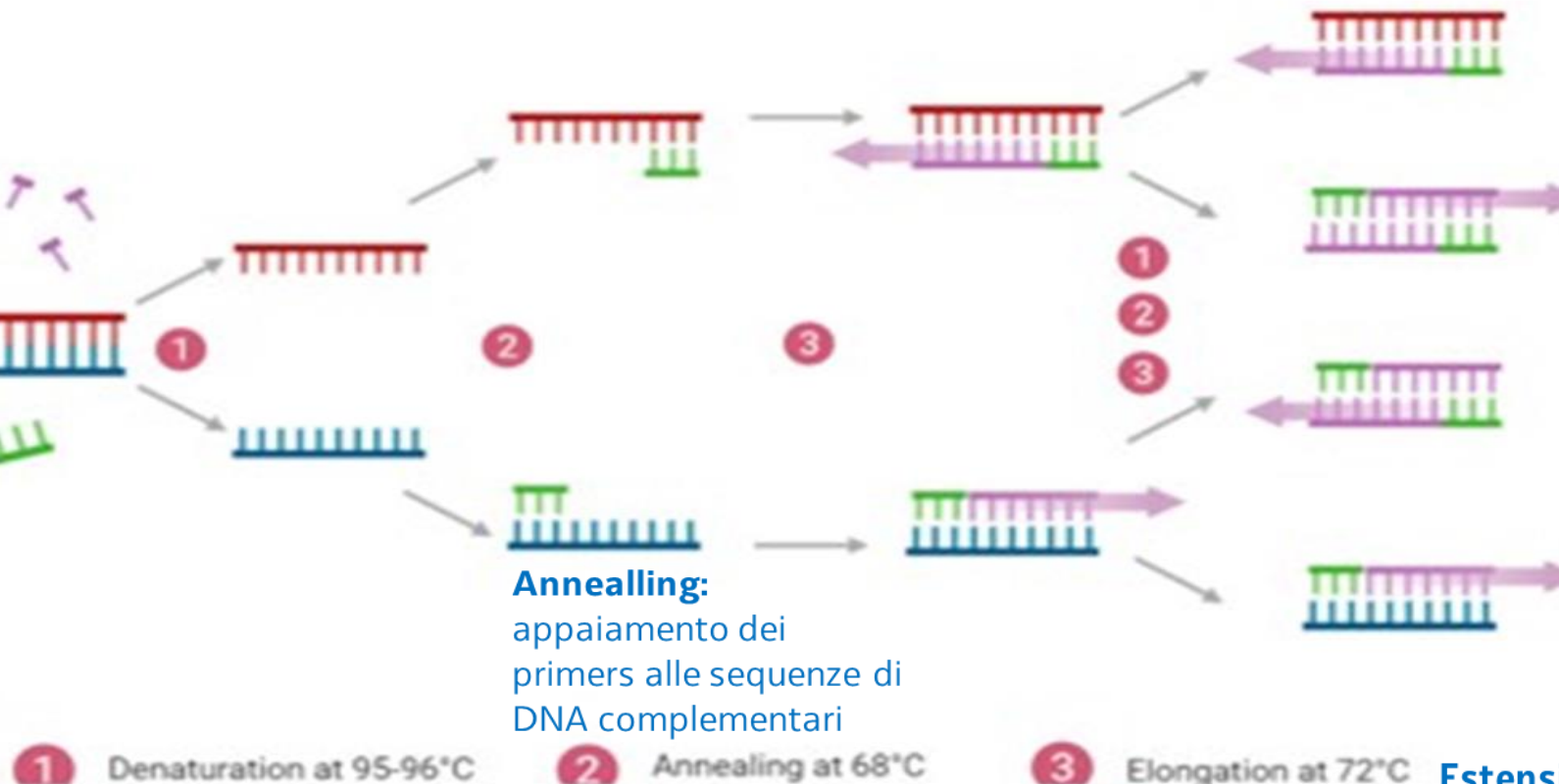
La reazione prevede tre fasi:

- **Denaturazione** della doppia elica del DNA stampo (95°);
- **Annealing**: appaiamento dei primers alle sequenze di DNA complementari: oligonucleotidi a singolo filamento che, accoppiandosi in maniera specifica, forniscono gli elementi di innesco per l'aggiunta di nucleotidi (50-70°C);
- **Estensione dei primer**: grazie all'aggiunta di nucleotidi in direzione 5'-3' da parte dell'enzima DNA polimerasi

Reazione di amplificazione

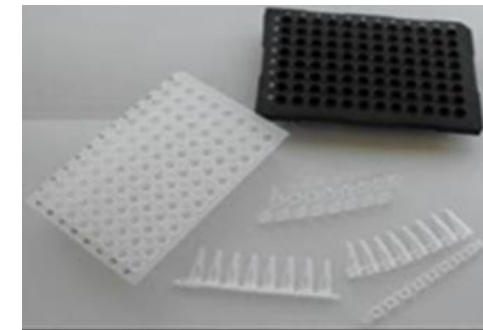
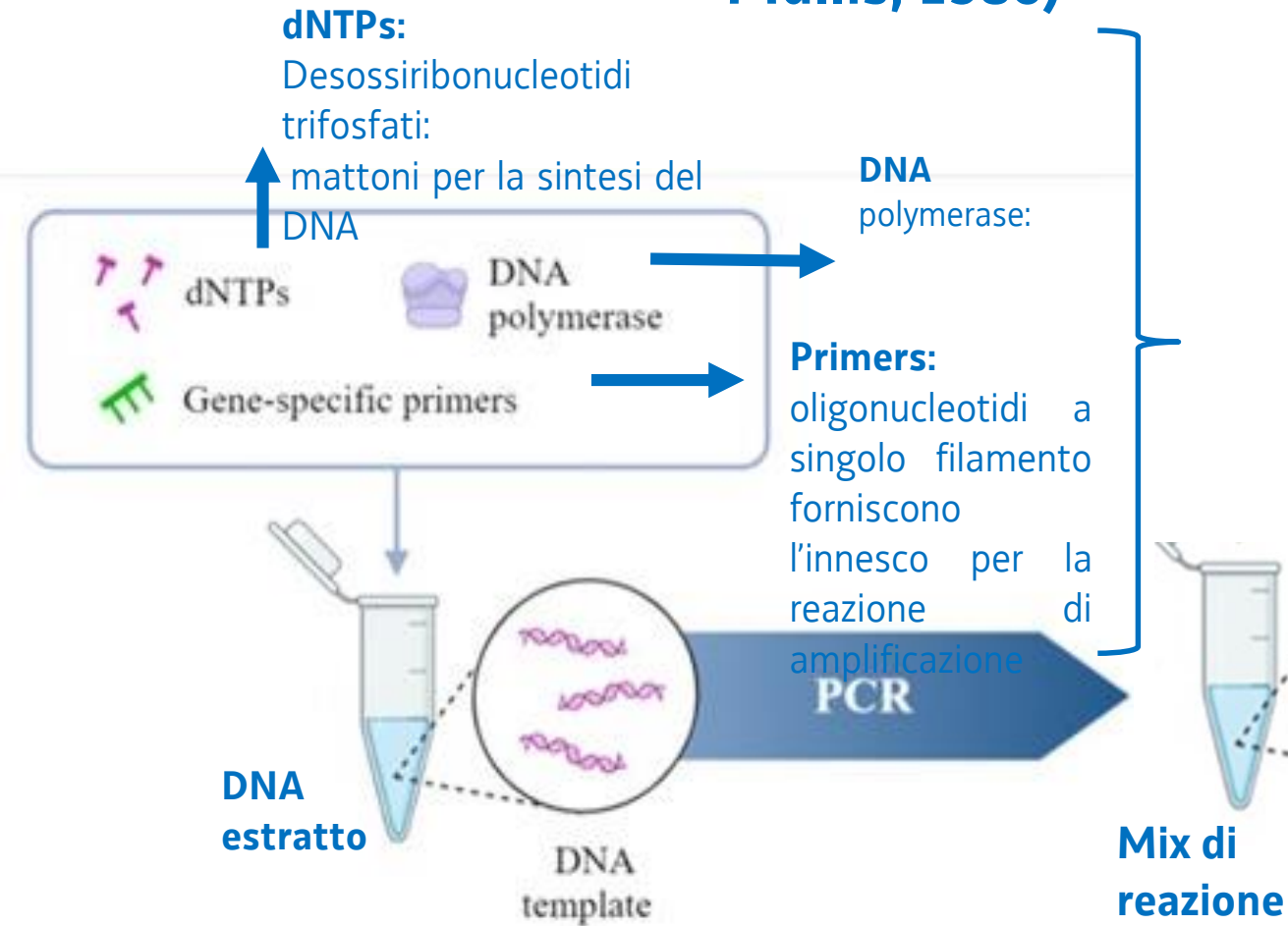
Denaturazione
della doppia
elica – 95°C
DNA stampo

Annealing:
appaiamento dei
primers alle sequenze di
DNA complementari



Estensione: grazie all'aggiunta di nucleotidi in direzione 5'-3' da parte dell'enzima Taq DNA polimerasi - batterio *Thermus aquaticus* (68-72°C).

PCR Polimerase chain reaction – reazione a catena della polimerasi (Kary Mullis, 1986)



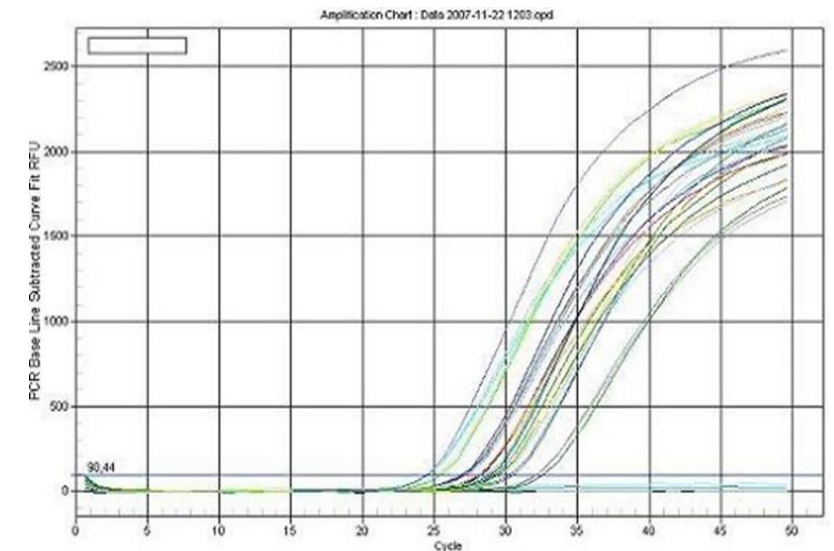
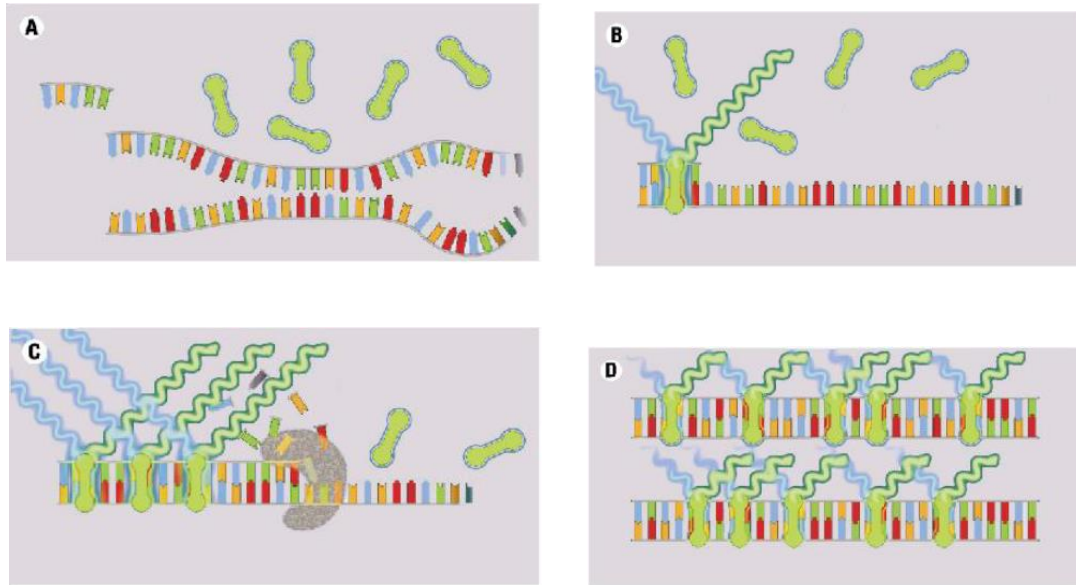
**Allestimento
piatto di reazione**



**Termociclatore:
Protocollo termico
Protocollo piatto**

Al fine di ottenere la sintesi di un filamento di DNA complementare al DNA stampo medesimo.

E' un metodo che simultaneamente amplifica (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantifica il DNA. Tecnica che si basa su una tecnica di fluorescenza, la **FLUORESCENZA EMESSA** è correlata direttamente con la quantità di DNA amplificato.



Mix di reazione:

- Taq polymerasi
- dntp's
- Primers
- **Sonda** →
- DNA stampo

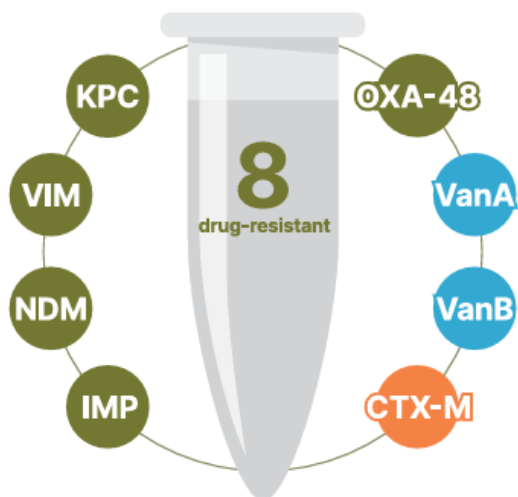
Oligonucleotidi marcati con molecole fluorescenti:
Aventi un colorante fluorescente Reporter e uno spegnitore Quencer.
Fino a che la sonda è legata alla sequenza di DNA non emette fluorescenza quando la Taq è attiva cioè non è in atto la duplicazione della sequenza del DNA allora la sua attività esonucleasica degrada la sonda e Quencer e Reporter si allontanano e a questo punto il Reporter emette fluorescenza.

L' incremento di amplificato viene rilevato monitorando l'incremento di fluorescenza (aumento esponenziale che raggiunge un plateau)

Real Time PCR Multiplex: permette l'identificazione simultanea di uno o più target genetici.

Ricerca di geni AMR in campioni di acque reflue: protocollo Allplex Entero – DR Assay (Seegene)™

Consente l'amplificazione e il rilevamento in simultanea di:



- cinque geni codificanti per carbapenemasi: **blaKPC**, **blaNDM**, **blaVIM**, **blaOxa-48** e **blaIMP**
- due geni conferenti resistenza alla vancomicina: **VanA** e **VanB**;
- gene beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL): **CTX-M**

Procedimento per la ricerca qualitativa di geni AMR (PCR RT Multiplex) in acque reflue:

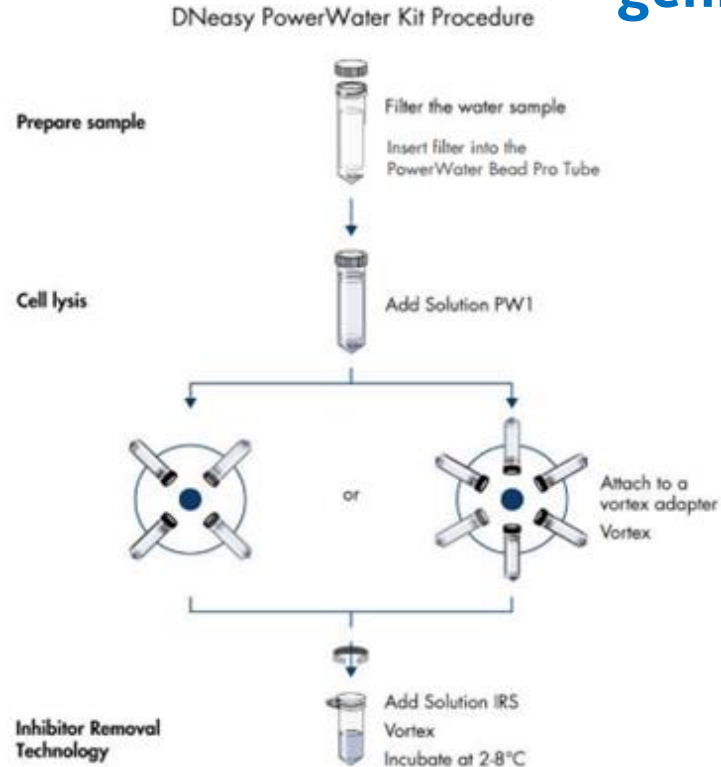


- 1) Concentrazione del campione: filtrare 100 ml di campione (se possibile) per filtrazione su membrana in PES, porosità 0,22 μm e diametro 47mm.



- 2) Estrazione del DNA: kit DNAeasy PowerWater Kit Qiagen TM – sistema automatizzato.

Procedimento per la ricerca qualitativa di geni AMR (PCR RT Multiplex) in acque reflue:



- **lisi cellulare** di tipo fisico tramite biglie di legame con distruzione della membrana cellulare
- **adsorbimento**: il DNA si lega ad una membrana adsorbente contenuta in una colonnina;
- **lavaggio** dalle impurità tramite soluzioni di etanolo;
- **eluizione**: distacco degli acidi nucleici dalla membrana

3) Quantificazione del DNA: ng/ul

Metodo spettrofotometrico: misura dell'assorbanza a 260nm.

Metodo fluorimetrico: fluorofori che si legano al DNA. Tali molecole sottoposte a una determinata lunghezza d'onda emettono segnale luminoso fluorescente



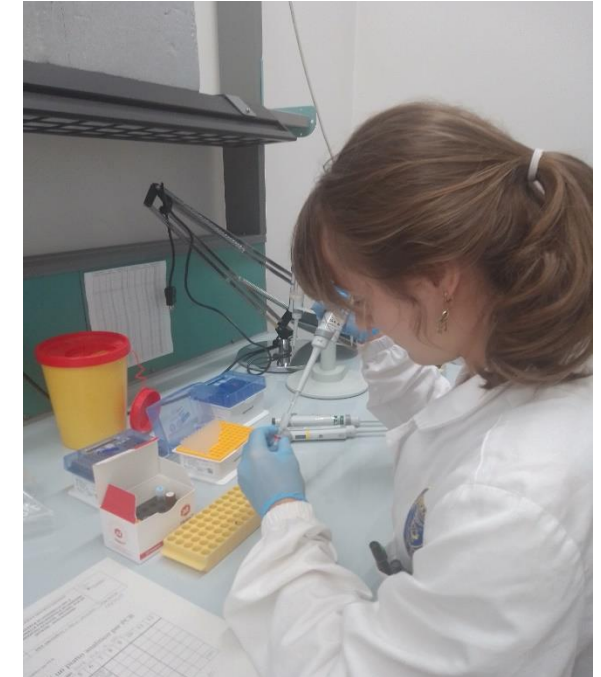
4) DNA estratto
quantificato (ng/ul)



e

5) Mix di reazione: protocollo Entero-DR (Seegene):

- DNA estratto
- Enzima Taq polimerasi
- Primers
- dNTPs
- Sonde fluorescenti
- Buffer di reazione
- acqua



6) Preparazione della mix di reazione: calcolare la quantità di ciascun reagente in base al numero di campioni compresi controlli positivi e negativi



7) Preparazione del piatto di reazione:
15ul di mix e 5 ul di DNA di campione
(compresi controlli negativi e positivi)



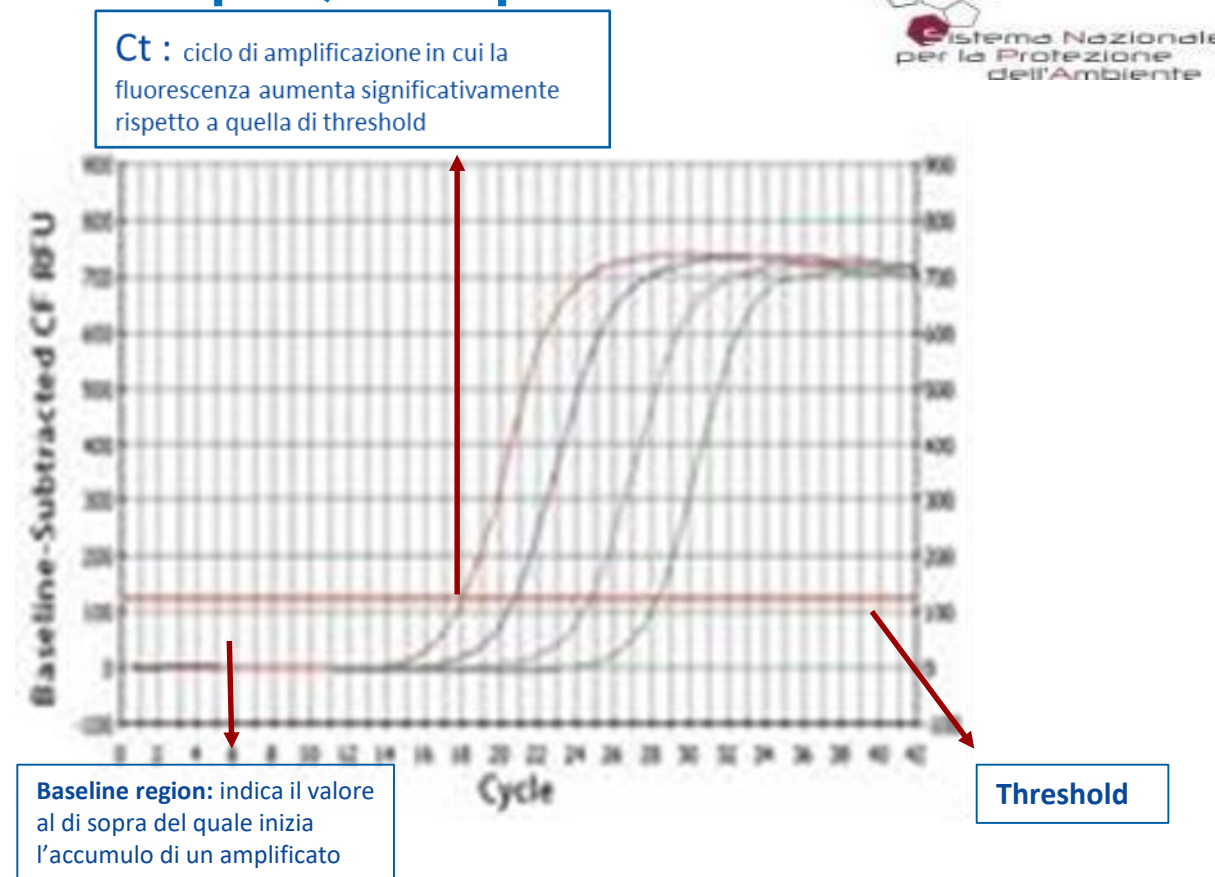
8) Termociclature: allestire il protocollo termico e
protocollo di piatto. Reazione di amplificazione

Procedimento per la ricerca qualitativa di geni AMR (PCR RT Multiplex) in acque reflue:



L'apparecchiatura permette di seguire graficamente in tempo reale l'andamento della amplificazione Curva sigmoideale:

- ✓ il prodotto della PCR si raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione ma nelle prime fasi dell'amplificazione la quantità di DNA Amplificato è troppo poco per essere rilevato mentre nelle fasi finale i reattivi cominciano a scarseggiare e la curva comincia ad appiattirsi. La quantificazione si determina nella fase esponenziale (quantità ideale di prodotto rilevabile e nessun fattore limitante) in particolare quando l'amplificato supera la linea di threshold.



Sono positivi i campioni il cui ciclo soglia (Ct) supera il valore di fluorescenza indicato dal valore di fondo -threshold

Allplex™ Entero-DR Assay

Sample No			
Patient Id		Patient Name	1525/25
Well	[C02]	Data Analysis Time	2025-04-02

- SAMPLE -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
IMP, VIM	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	32.54	-	N/A	+	24.33	+	24.44

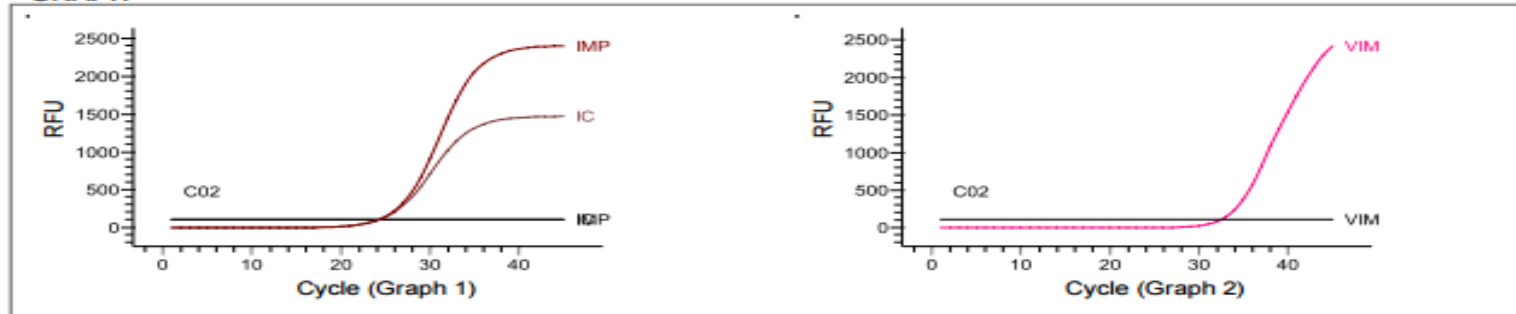
- POSITIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Positive Control(+)	+	20.96	+	19.80	+	19.00	+	19.55	+	18.32	+	18.61	+	20.18	+	19.00	+	19.76

- NEGATIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Negative Control(Invalid)	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.82

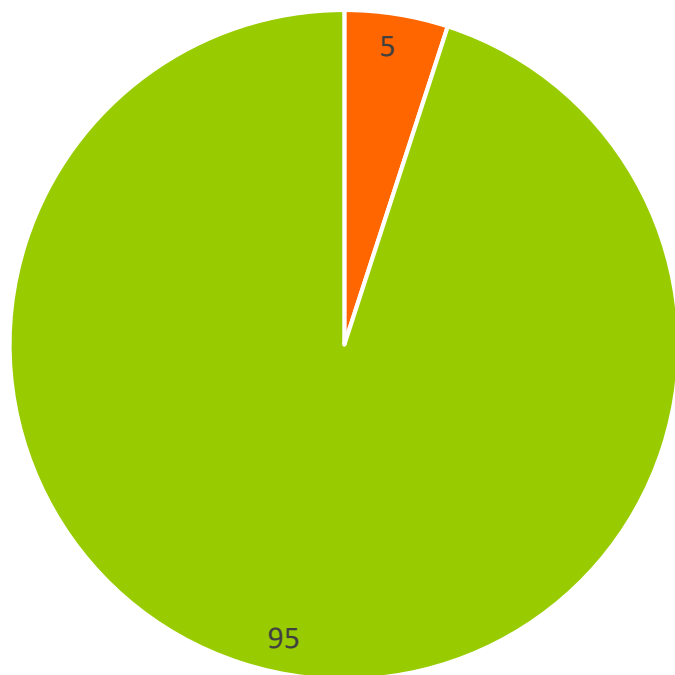
- GRAPH -



Report contiene:

- Dati del campione;
- Risultato del controllo positivo;
- Risultato del controllo negativo;
- Risultati del campione: sono positivi i campioni il cui ciclo soglia (Ct) supera il valore di fluorescenza indicato dal valore di fondo -threshold;
- Il grafico di amplificazione: Cycle-RFU

Risultati PCR Multiplex



■ % CAMPIONI NEGATIVI ■ % CAMPIONI POSITIVI ■ ■

- Numero totale campioni acque reflue in entrata ed uscita complessivamente analizzati 2024-2025: **100**
- **10** campioni di acqua reflua in ingresso impianto
- **90** campioni di acqua reflue in uscita impianto
- % Campioni positivi: >95% presenta almeno uno dei geni ricercati con la **PCR Multiplex**

Dropa, M., et al. (2024). Spread and persistence of antimicrobial resistance genes in wastewater from human and animal sources in São Paulo, Brazil. *Tropical Medicine & International Health*, 29(5), 424–433.

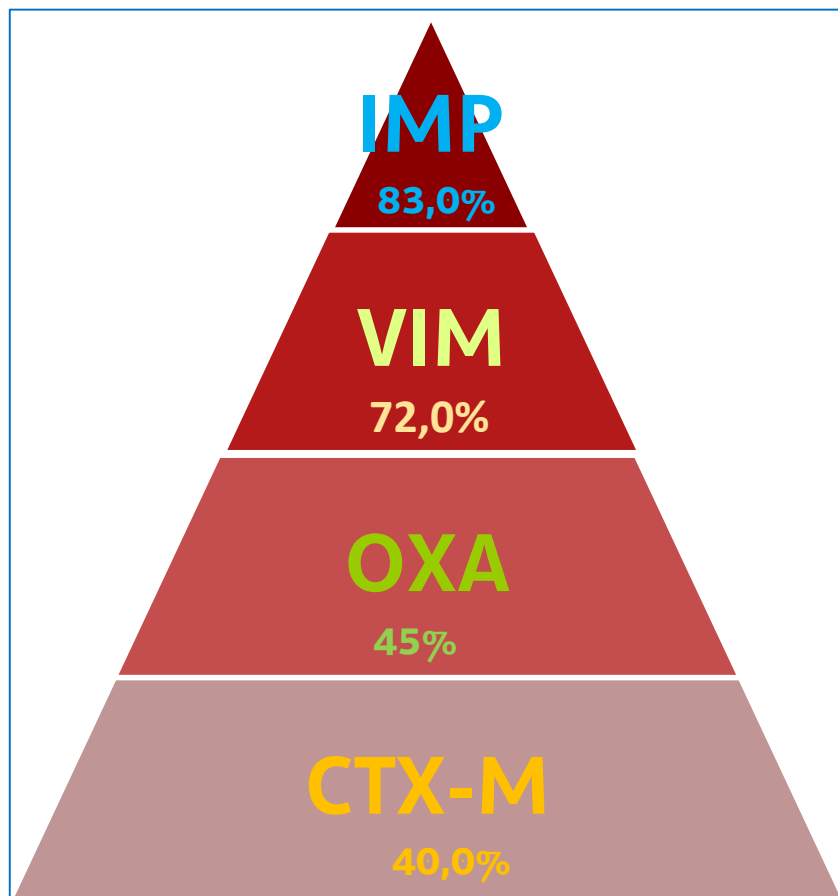
<https://doi.org/10.1111/tmi.13986>

Hendriksen, R. et al. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>

Waśko, I., et al. (2022). Clinically Relevant β -Lactam Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), 13829.

<https://doi.org/10.3390/ijerph192113829>

Risultati: % geni presenti nei campioni analizzati



blaIMP : il gene IMP, codificante per l'enzima imipenemasi, conferisce resistenza ai carbapenemi, in particolare Imipenem e Meropenem, e ai monobattami. Per la prima volta fu riportato in Giappone nel 1998 da *P. aeruginosa* e ad oggi è ampiamente diffuso in tutto il mondo. Non sono ancora note le specifiche sequenze codificanti le sue varianti genetiche (Pongchaikul & Mongkolsuk, 2022).

blaVIM : Verona integron-encoded metallo β -lactamase, isolato in Italia nel 1999, è presente per lo più in *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida*, piuttosto che in *Enterobacteriaceae*. È spesso associato a plasmidi e codifica per enzimi β -lattamasi, eccetto per la classe dei monobattami. Risulta particolarmente diffuso nell'Est asiatico [8].

blaOXA-48 : isolato per la prima volta nel 2001 in Turchia in *K. pneumoniae*, anche questo gene conferisce resistenza ai β -lattamici, in particolare ai carbapenemi. Inoltre, le sequenze OXA-48 sono spesso localizzate su plasmidi, che ne facilitano la diffusione anche in contesti comunitari. Alcuni gram-negativi interessati da OXA-48 sono *E. coli*, *K. pneumoniae* e *oxytoca*, *Acinetobacter baumannii* (Gurung et al, 2020).

bla CTX-M: ormai ampiamente diffuso a livello globale (Bevan et al., 2017), CTX-M ha probabilmente origine dal batterio rizosferico *Kluyvera ascorbata* che possiede il gene bla KLUA, responsabile della resistenza alle cefalosporine ed estremamente simile alle sequenze di CTX-M. Ciò suggerisce che il gene CTX-M abbia avuto origine dal tale microrganismo (Zhao & Hu, 2013). A d oggi CTX-M è stato ritrovato nei reflui urbani, acque marine e superficiali (Amos et al, 2014). Tale gene è responsabile alle resistenze ESBLs.

KPC	27,0%
VanB	27,0%
VanA	20,0%
NDM	1,0%

blaKPC : acronimo di *Klebsiella pneumonia carbapenemasi*, conferisce resistenza ai carbapenemi, rappresentando un grave problema per la salute, vista la sua facile diffusione in strutture ospedaliere, anche a livello intercontinentale. La sua diffusione riguarda anche altri batteri gram-negativi, oltre a *K. pneumoniae* (Arnold et al, 2011).

VanA e VanB : tali geni conferiscono resistenza a vancomicina e teicoplanina (glicopeptidi), in particolare per *Enterococchi* (si parla di VRE, *Vancomycin-Resistant Enterococci*), batteri gram-positivi presenti naturalmente nella flora intestinale e responsabili di alcune infezioni urinarie (Moosavian et al, 2018). Cong et al. (2019) riportano che *VanA* è stato inoltre isolato anche in *Staphylococcus aureus*, presente sulla cute e sulle membrane nasofaringee umane. Questi geni codificano per enzimi in grado di modificare la parte terminale della catena di peptidoglicano, impedendo all'antibiotico di legarsi efficacemente al substrato target (Halawa et al, 2024).

blaNDM : NDM codifica per l'enzima *New Delhi metallo-β-lattamasi* (MBL), in grado di idrolizzare molti antibiotici β-lattamici (Zhang et al, 2021). Isolato per la prima volta in *K. pneumoniae* a Nuova Delhi nel 2008 (Yong et al, 2009), ad oggi risulta il terzo gene codificante per carbapenemasi più diffuso, dopo KPC ed OXA-48 (Karlowsky et al, 2017).

Dep.	Tipologia campione	Famiglia antibiotici	Principio attivo (µg/L)		E. coli (UFC/100mL)	E. coli ESBL (UFC/100mL)	Geni AMR
1	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	6800000	170000	NDM, KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	20	1	KPC, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA
2	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	4500000	130000	NDM, KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	71	11	KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, Van B
3	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	610000	180000	KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	55000	600	KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
4	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	350000	70000	NDM, KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	12000	200	KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
5	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	155000	1000	KPC, OXA-48, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	28000	300	KPC, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-

Osservazioni:

- Principio attivo antibiotico ricercato assente ma presenza di geni come indicato in letteratura

(Wang, J. et al, (2020). Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. *Science of The Total Environment*, 744, 140997

- Geni AMR presenti in ingresso e uscita (diffusione di questi geni in ambiente come indicato in letteratura riferimento slide gene per gene)
- Principio attivo: LOQ 0,1 ug/l

Risultati complessivi aggregati: Tabella analisi depuratori ingresso/uscita 2025

Dep.	Tipologia campione	Famiglia antibiotici	Principio attivo (µg/L)		E. coli (UFC/100mL)	E. coli ESBL (UFC/100mL)	Geni AMR
6	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	1490000	48000	OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	8000	355	OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
7	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	200000	1000	NDM, KPC, OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	100	2	OXA-48, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-
8	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	1650000	29000	KPC, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	3000	34	KPC, OXA-48, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanA, VanB
9	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	6100000	69100	OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	400000	3300	CTX-M
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-
10	Ingresso	β – lattamici	Amoxicillina	0	22000	0	OXA-48, CTX-M, VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	VanB
	Uscita	β – lattamici	Amoxicillina	0	200	1	VIM, IMP
			Cefotaxime	0			
		Glicopeptidi	Vancomicina	0	non eseguito	non eseguito	-

- Il lavoro eseguito riguarda principalmente l'impatto sull'ambiente;
- Rilevata una distribuzione di questi geni nell'ambiente secondo quanto riportato in letteratura;
- Percentuale complessiva di positività campioni: **95%;**
- Considerati i 10 depuratori ingresso – uscita: **geni presenti prima e dopo il trattamento;**
- Necessità di quantificazione dei geni: **in corso prove di quantificazione presso il laboratorio ARPAFVG (gene KPC e CTXM)**
- Non è al momento disponibile un protocollo definitivo per la ricerca di geni AMR;
- Confronto tra E.coli – *E.coli* ESBL in ingresso e in uscita.

Grazie per l'attenzione

Studi di antibiotico resistenza in regione FVG

Parte 2: Sequenziamento di DNA

Sebastiano Muscia

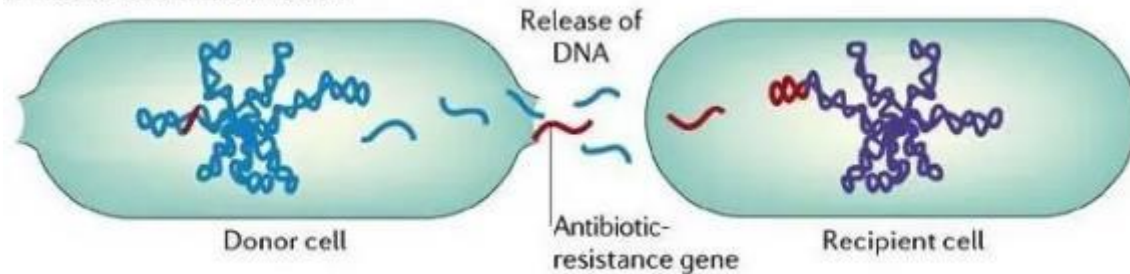
Arpa FVG Laboratorio alimenti e microbiologia, Udine

I batteri nell'ambiente sono in grado di acquisire e scambiarsi materiale genetico tra loro tramite un processo detto *horizontal gene transfer* (HGT)

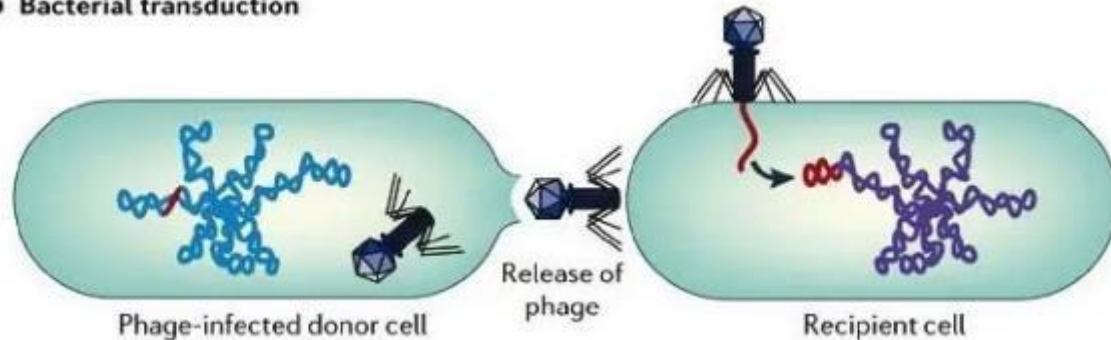
Meccanismi:

1. Trasformazione: passaggio di frammenti di DNA libero in ambiente ad altri batteri;
2. Trasduzione: mediata da batteriofagi;
3. Coniugazione: trasferimento di DNA tra batteri mediante pili batterici.

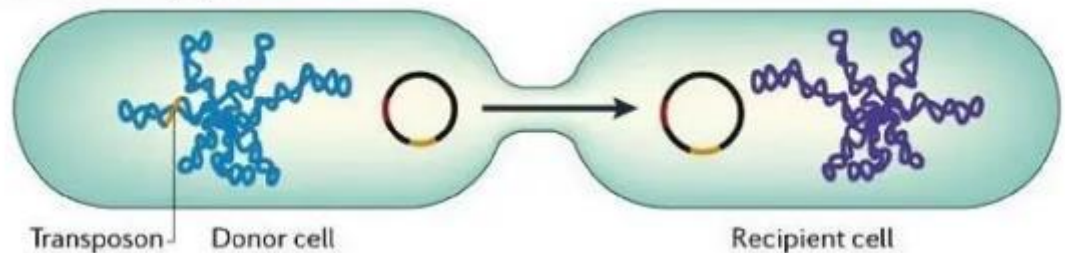
a Bacterial transformation



b Bacterial transduction



c Bacterial conjugation

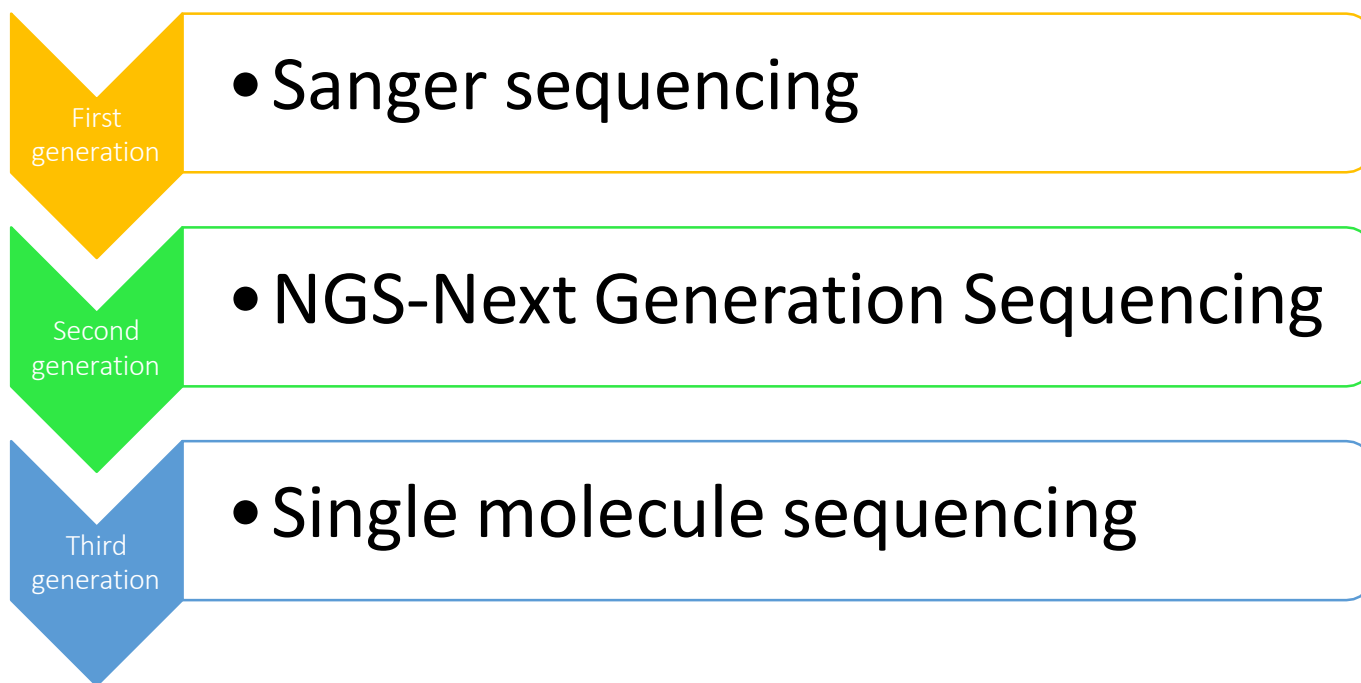


Source: Gene Transfer Mechanism in Bacteria and It's types by Acharya Tankeshwar in Molecular Biology

COSA SI INTENDE PER SEQUENZIAMENTO DEL DNA ?

Sequenziamento del DNA: la determinazione dell'esatto ordine dei nucleotidi (e quindi delle quattro basi azotate che li differenziano: adenina, citosina, guanina e timina) che costituiscono l'acido nucleico.

TECNICHE A DISPOSIZIONE

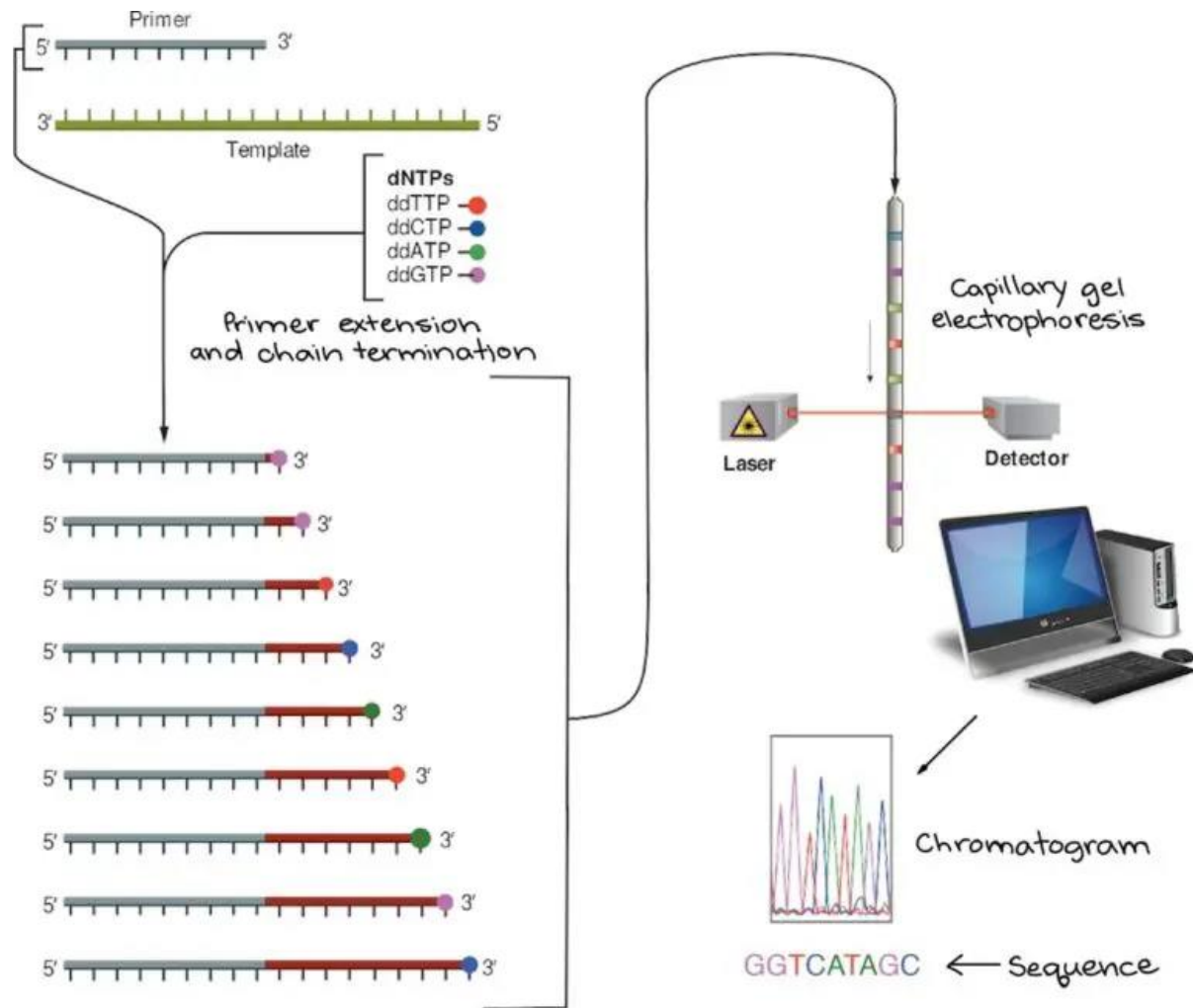


Sequenziamento I generazione: SANGER

Sequenziamento di tipo enzimatico, sfrutta la DNA polimerasi e dei primer complementari alla regione del DNA stampo, 4 deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per allungare la catena.

I sequenziatori automatici utilizzano i ddNTPs (marcati con 4 fluorofori) dentro un'unica reazione, che corre in un capillare. Ogni filamento di DNA emette una luce di colore diverso in base al ddNTP col quale termina.

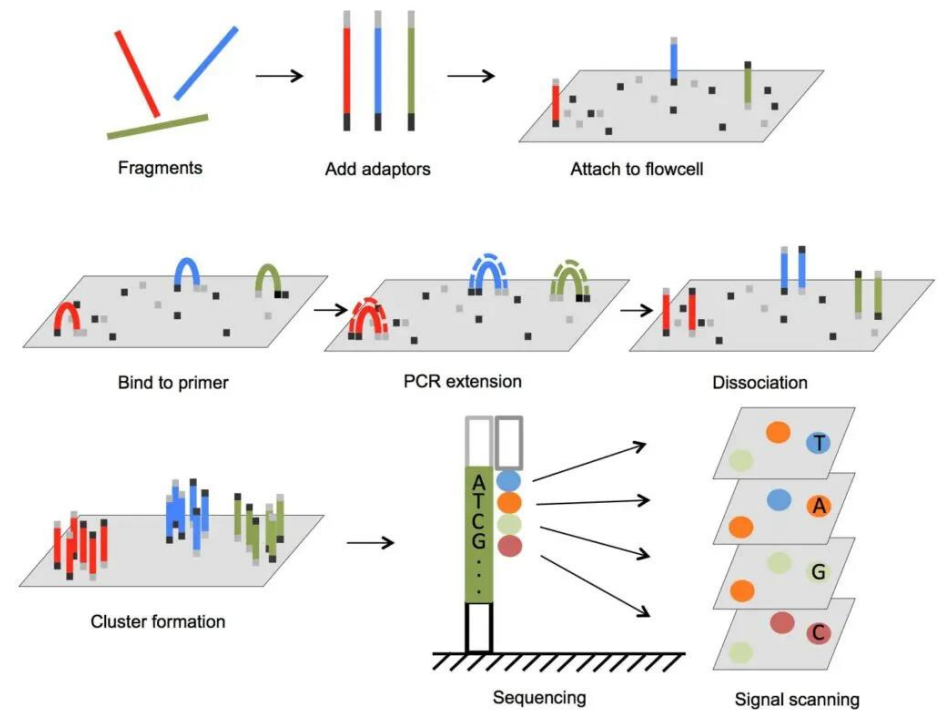
Leggendo gli elettroferogrammi possiamo ricostruire la sequenza di basi del DNA



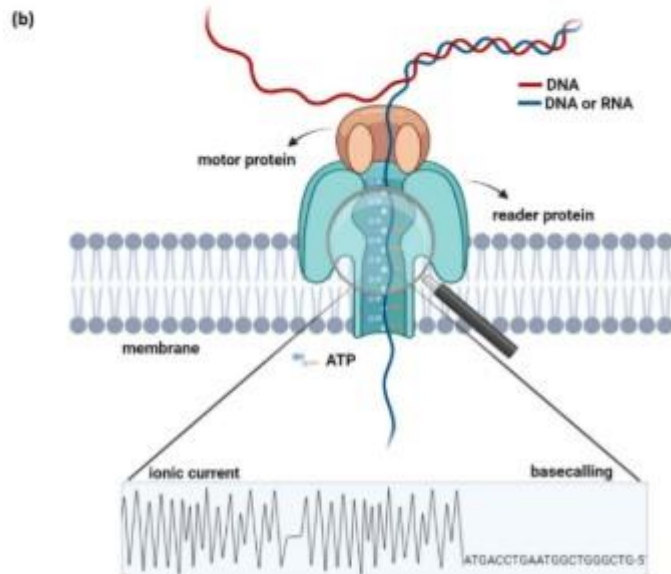
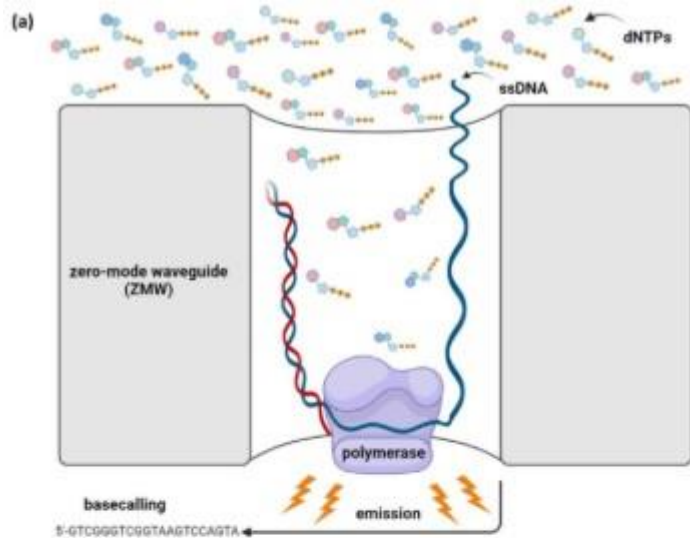
Source: Wikimedia commons <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>

Metodiche high throughput (**sequenziamento ad alta resa**) di NGS (Next Generation Sequencing) possiamo sequenziare **contemporaneamente più regioni geniche** dello stesso campione e processare **più campioni** nella stessa medesima corsa analitica

Sequenziamento in parallelo di frammenti di DNA legati sulla superficie della *flowcell* ed amplificati mediante un'amplificazione a ponte



Source: He, Ziyu & Chen, Zhu & Tan, Miduo & Elingarami, Sauli & Liu, Yuan & Li, Taotao & Deng, Yan & He, Nongyue & Li, Song & Fu, Juan & Li, Wen. (2020). A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. Cell Proliferation. 53. 10.1111/cpr.12822.



Il sequenziamento di terza generazione permette di sequenziare frammenti molto più lunghi (read lengths). Mentre il sequenziamento di seconda generazione (NGS) produce frammenti più corti (es. 150-600 bp), quello di terza generazione consente letture molto più lunghe, fino a superare i 10.000 bp.

Source: **Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics** Konstantina Athanasopoulou, Michaela A. Boti, Panagiotis G. Adamopoulos*, Paraskevi C. Skourou and Andreas Scorilas Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15701 Athens, Greece

VANTAGGI:

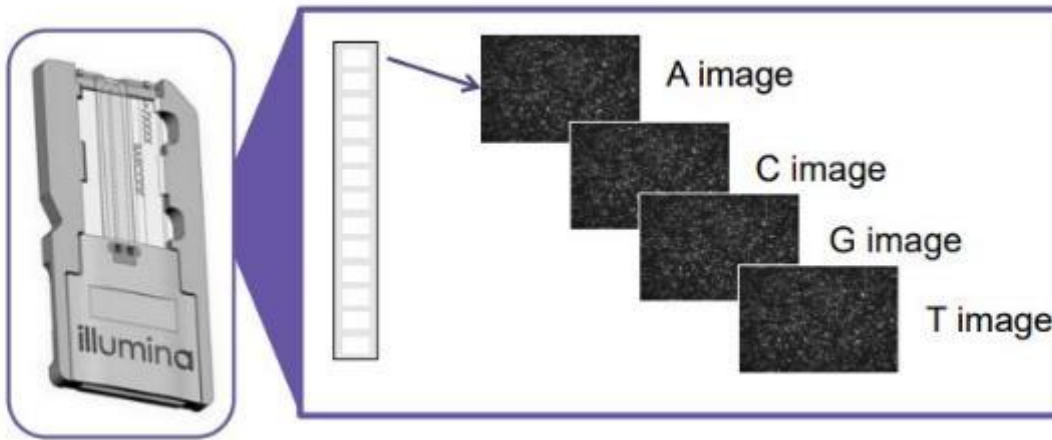
- ✓ Generazione di sequenze in parallelo;
- ✓ Sequenziamento massivo;
- ✓ Non è più indispensabile il clonaggio in vettori batterici o virali;
- ✓ Non è più necessaria la fase di migrazione dei frammenti su gel o in capillare per ottenere la sequenza;
- ✓ La lettura della sequenza è effettuata *step-by-step*

LIMITI:

- Mole di dati che richiede personale specializzato per l'analisi;
- Strumentazione dedicata;
- Costi elevati sui piccoli numeri

8

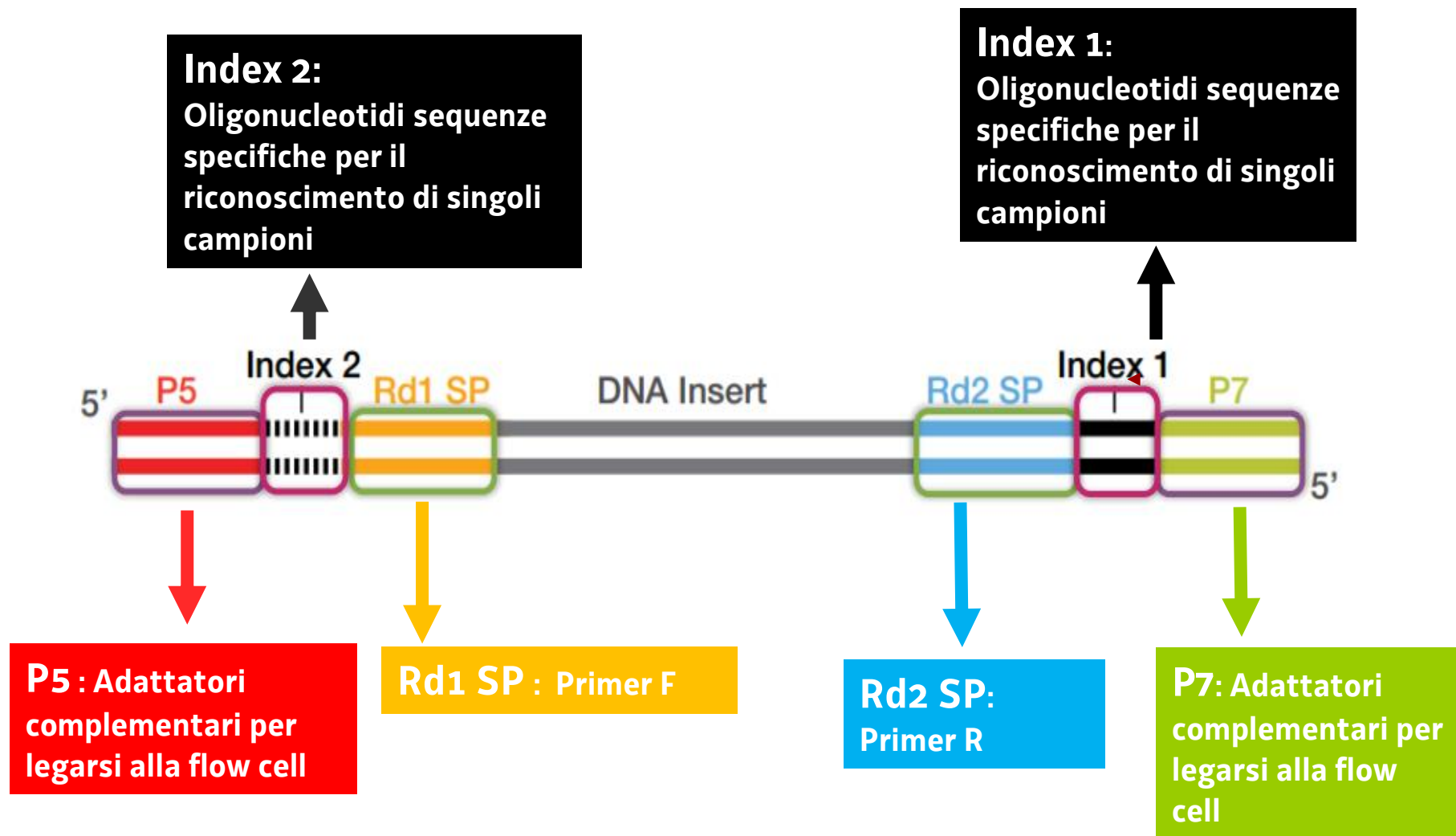
IL SUPPORTO ALLA REAZIONE: LA FLOW CELL e la cartuccia



FLOW CELL: lane uniforme e casuale di sequenze di oligonucleotidi complementari agli adattatori

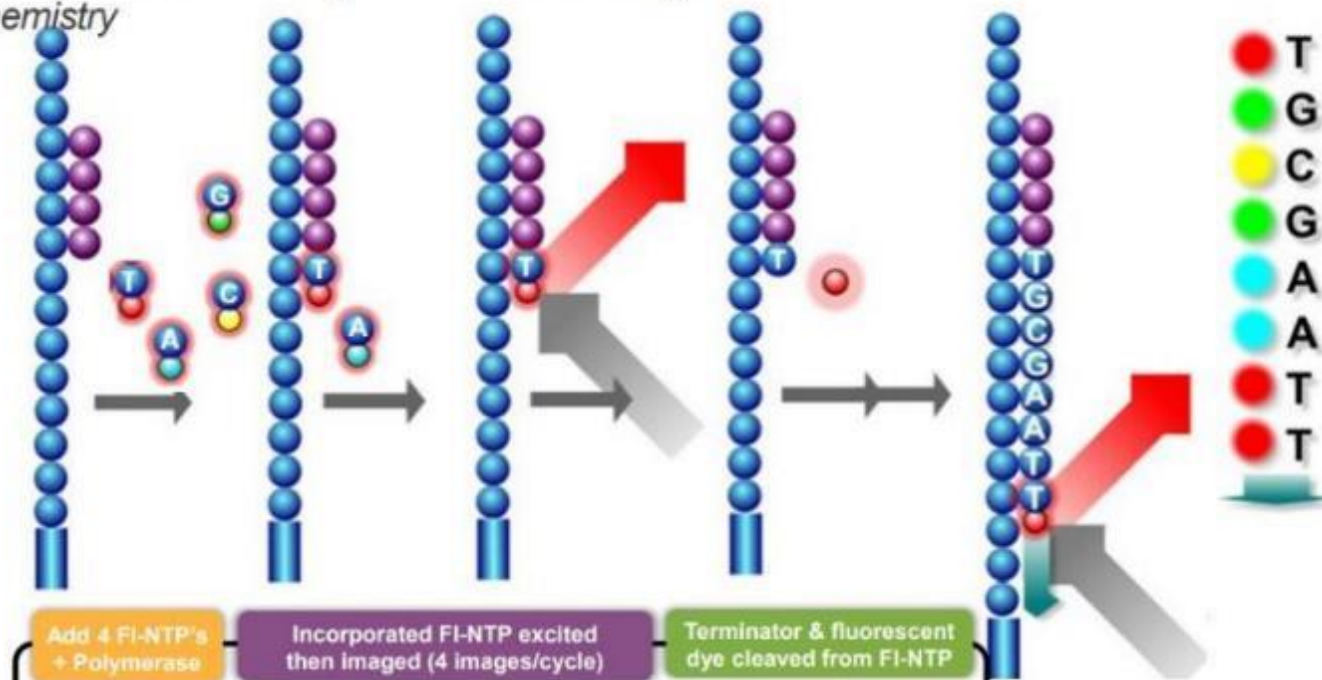
Cartuccia monouso contenente i reagenti necessari



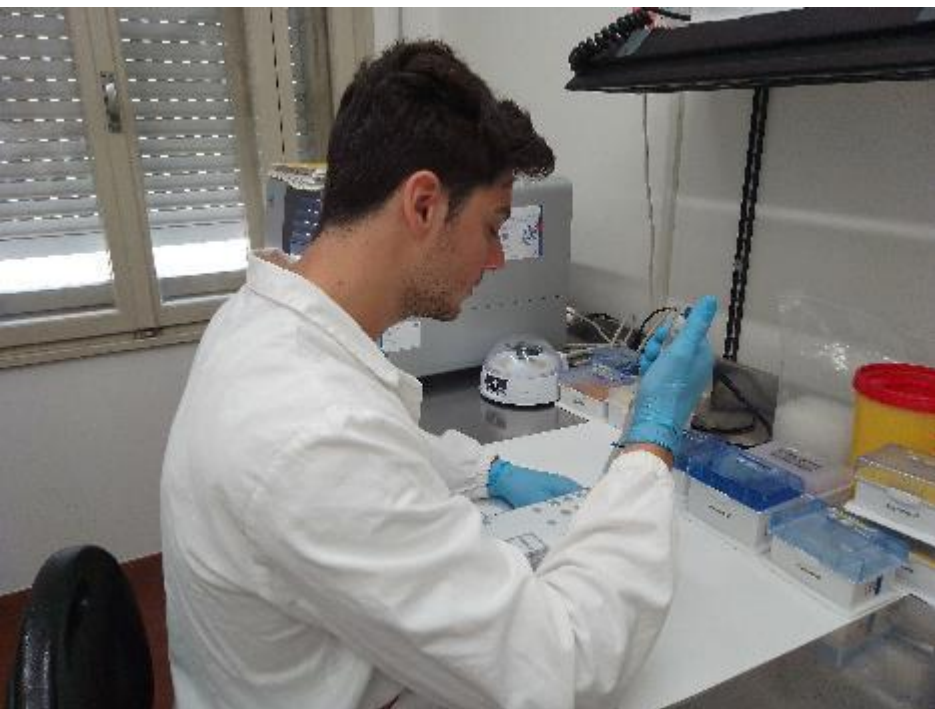


A Closer Look At 4-Dye Chemistry

Four channel chemistry



Caricamento della library sulla cartuccia e caricamento sul sequenziatore



Analisi primaria

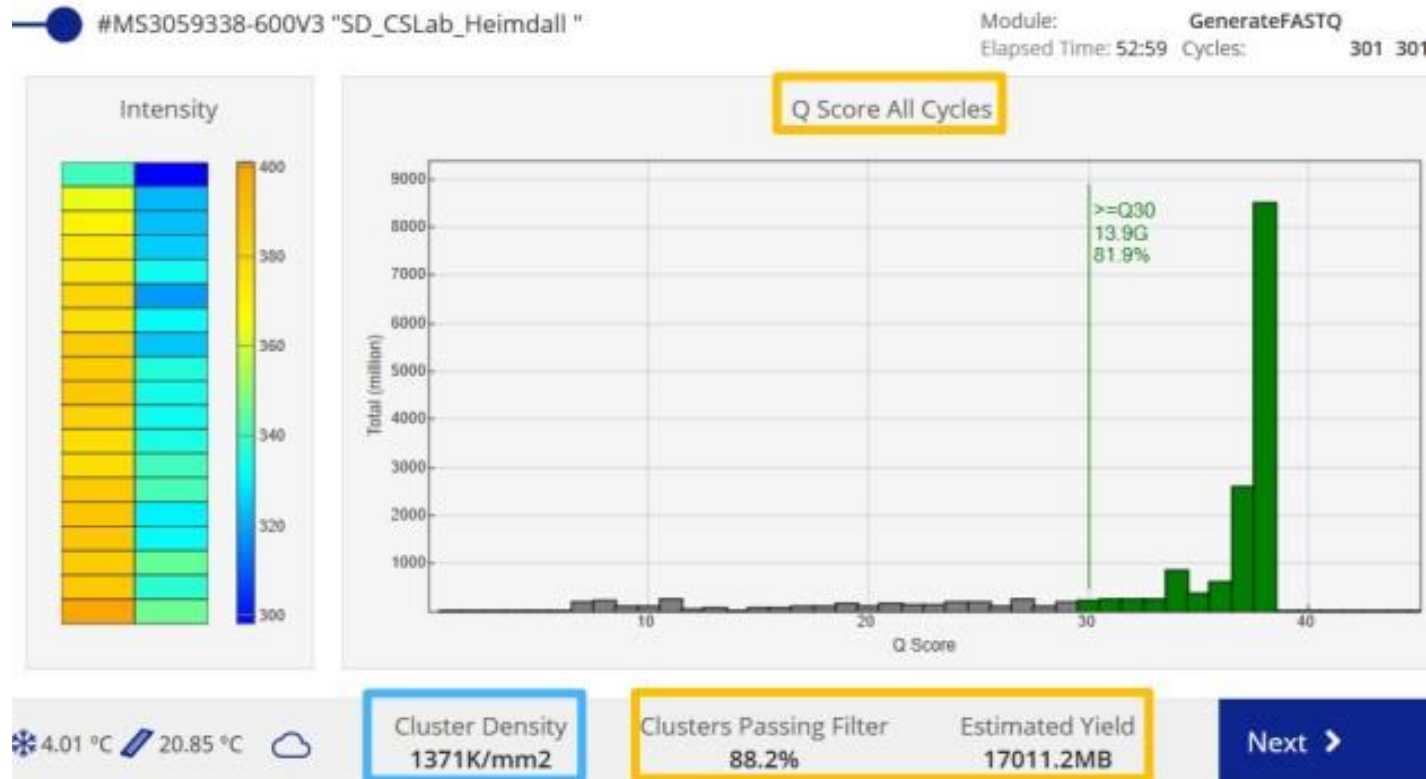
Analisi secondaria

Analisi terziaria

Software	Outputs
Real Time Analysis RTA Universal Copy Service UCS 	  Images, Intensities and Base Calls
 Local Run Manager LRM 	 Alignments, Variant Detection
 	  Annotation, Filtering, Reports

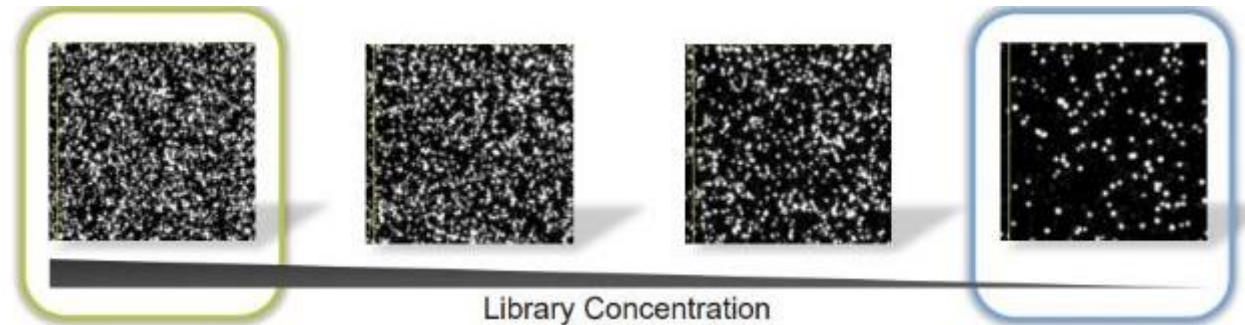
Valutazione qualità della corsa:

- **Q₃₀** (affidabilità chiamata basi)
- **Cluster density** → 1200-1400 k/mm²
- **Passing filter** → >90%
- **Yield** → quanto dato è stato generato



Source: illumina website <https://www.illumina.com/>

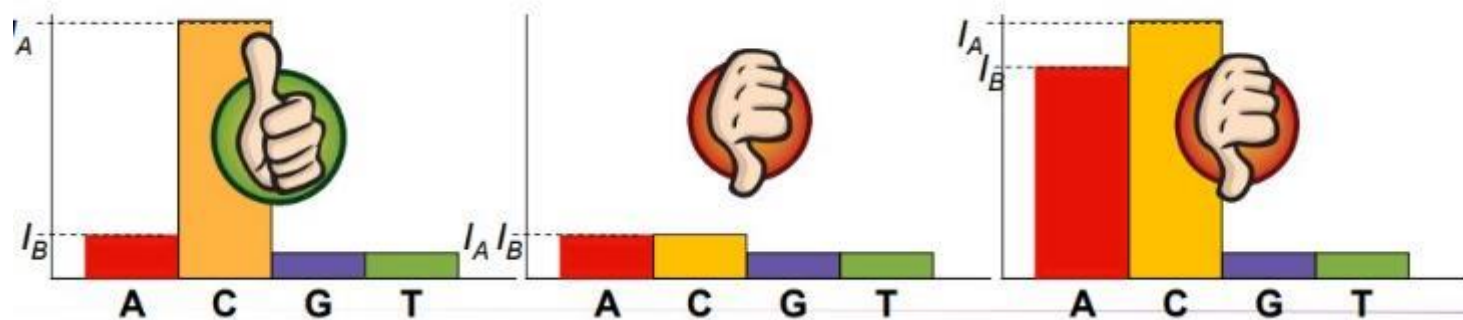
Cluster density



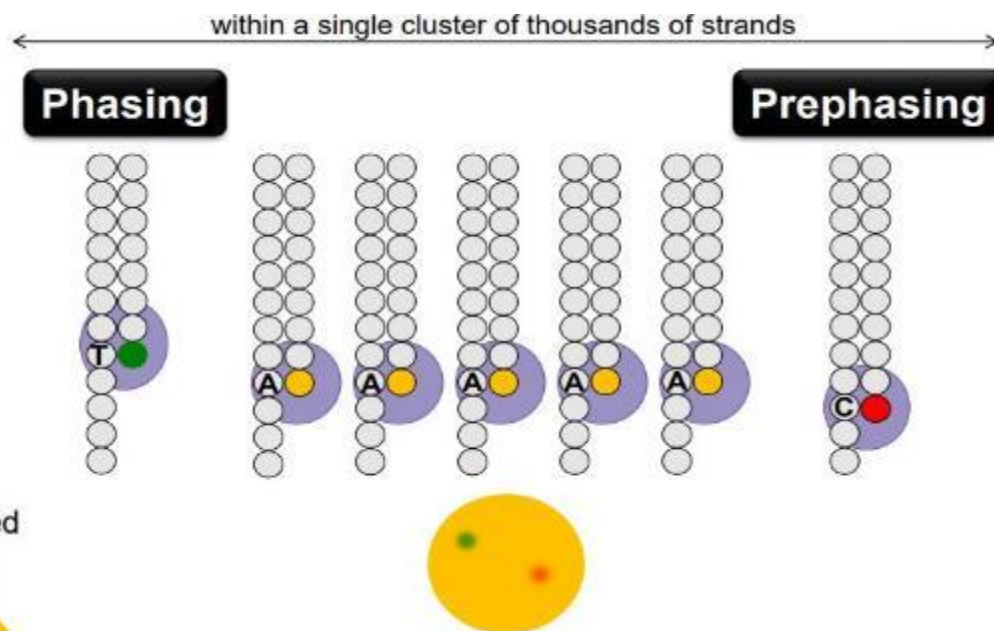
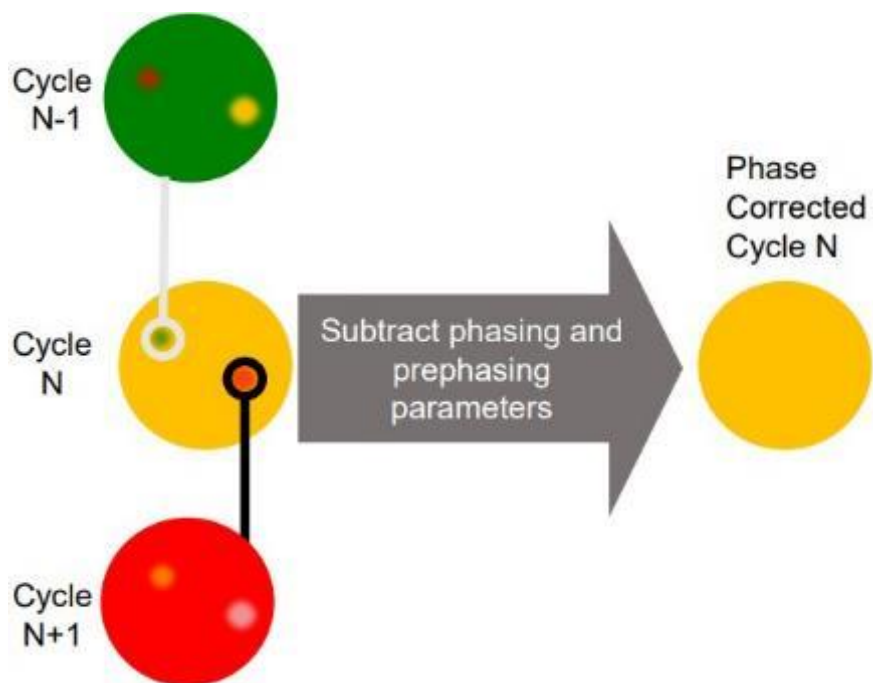
Overclustering

Underclustering

Passing filter



Phasing e prephasing correction



Che informazioni si possono ricavare da un sequenziamento genomico ?

- Identificazione batterica;
- Identificazione sierogruppi/sierotipi;
- Rilevazione di varianti;
- Rilevazione di geni di antibiotico resistenza;
- Comparazione di isolati batterici diversi;
- E molto altro...

Copre un ampio range di specie batteriche (121)

Include 3761 markers associati all'antibiotico resistenza verso 17 classi di antibiotici

Sfrutta un approccio di metagenomica di precisione di *targeted enrichment*

Permette di sequenziare le regioni **target** ricercate

Bacteria				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>E molti altri</i>

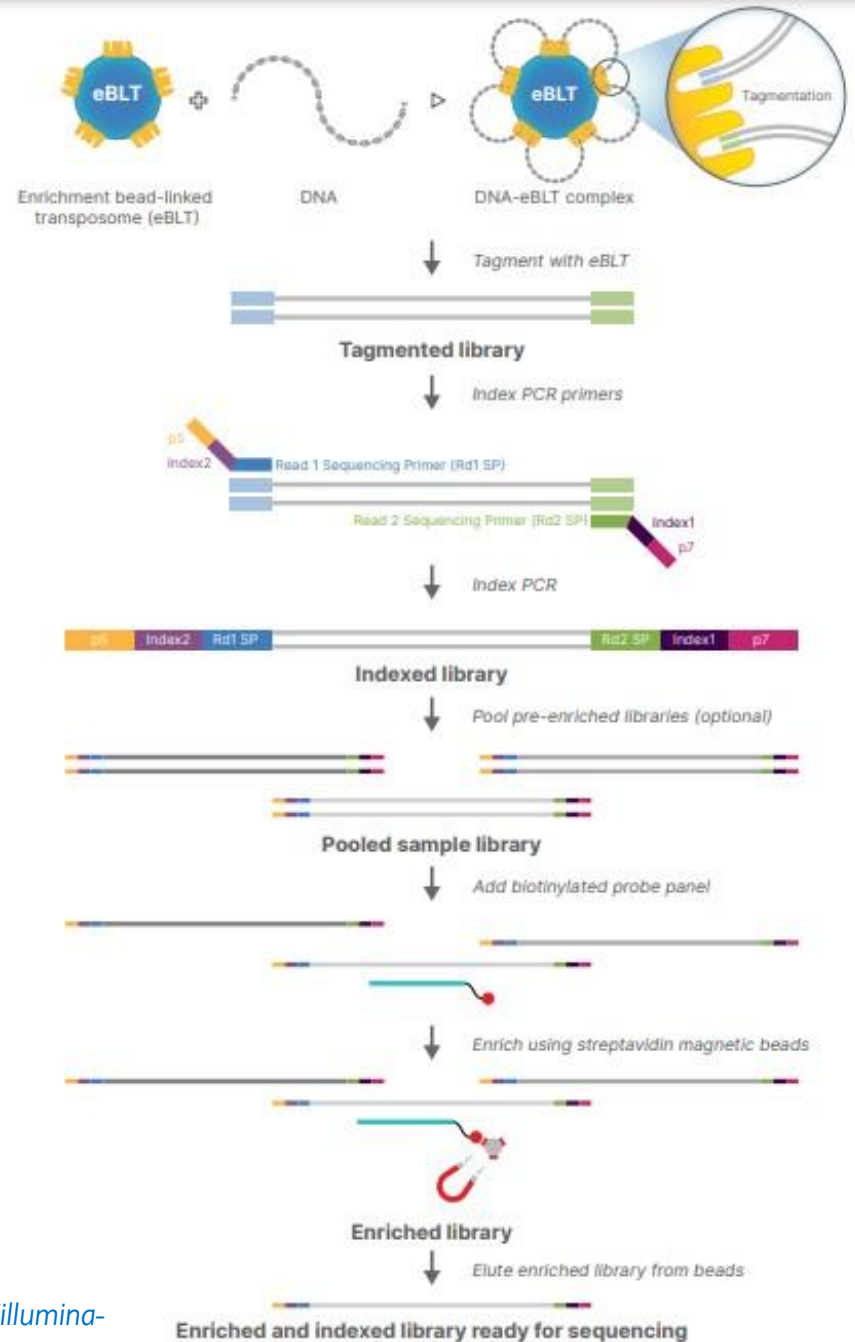
35 virus, 14 funghi, 4 parassiti



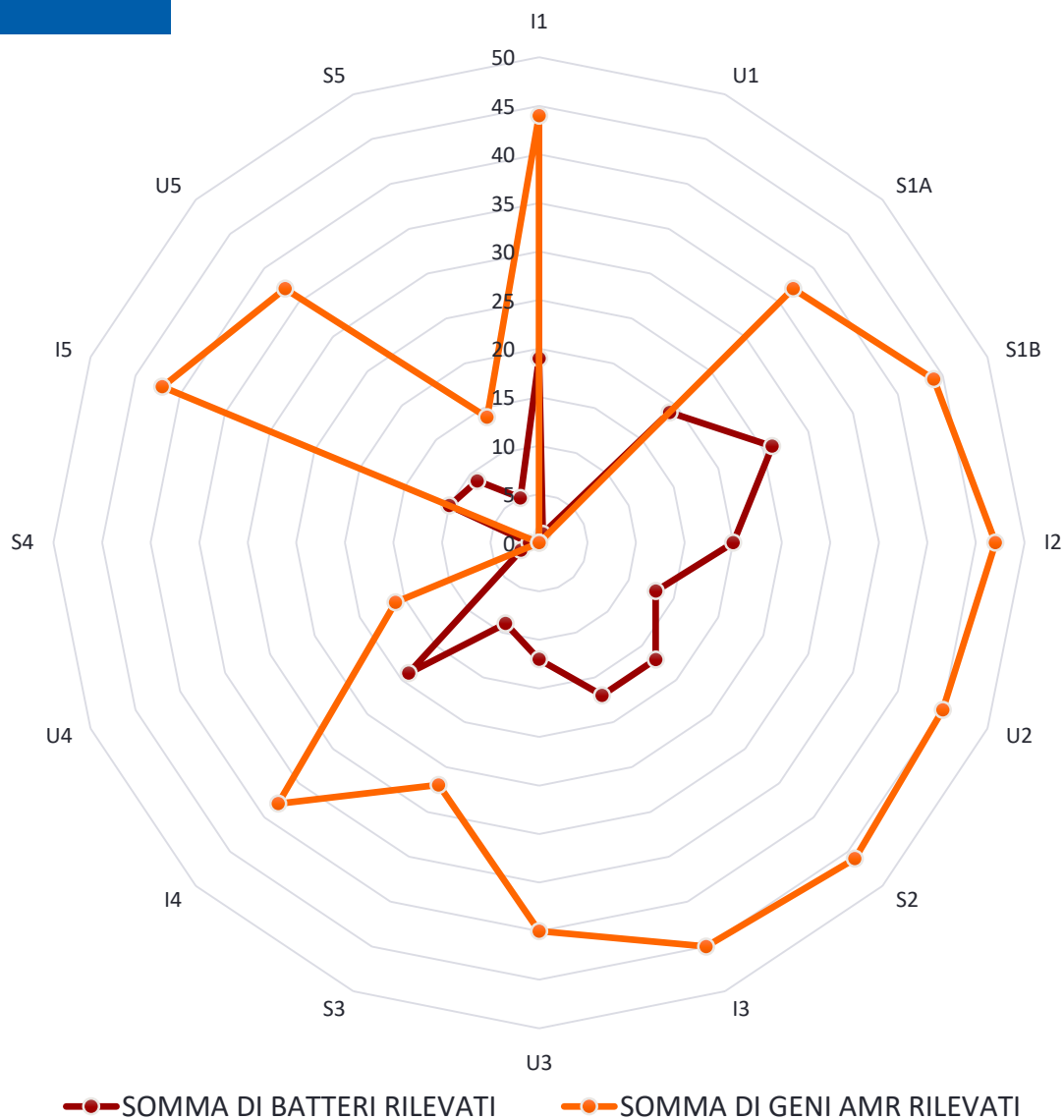
BK polyomavirus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes simplex, Human adenovirus, Human herpesvirus, Human papillomavirus, JC polyomavirus, Molluscum contagiosum virus, Simian virus 40

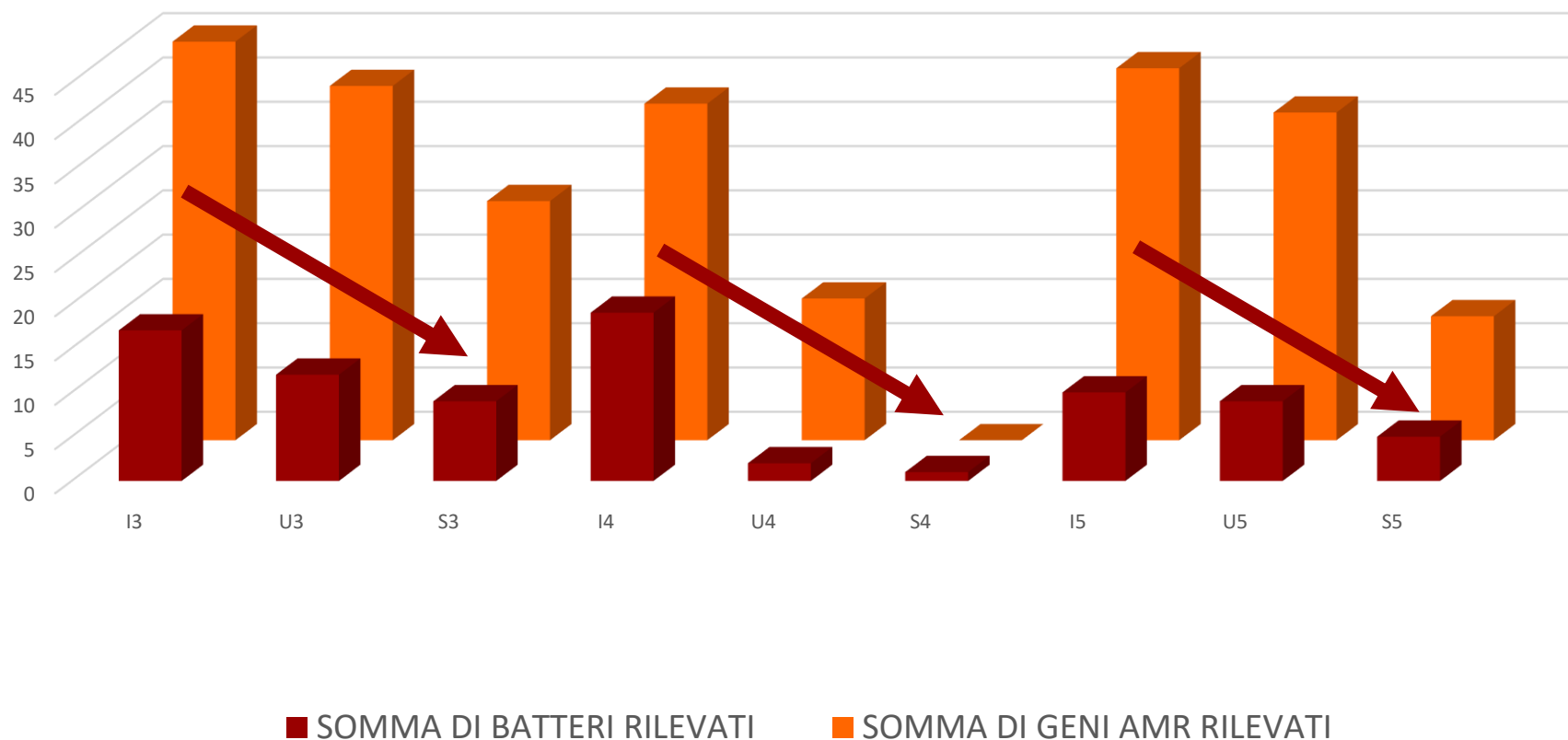
Per il nostro studio di AMR abbiamo utilizzato un approccio di library prep basato sulla metodica di target enrichment

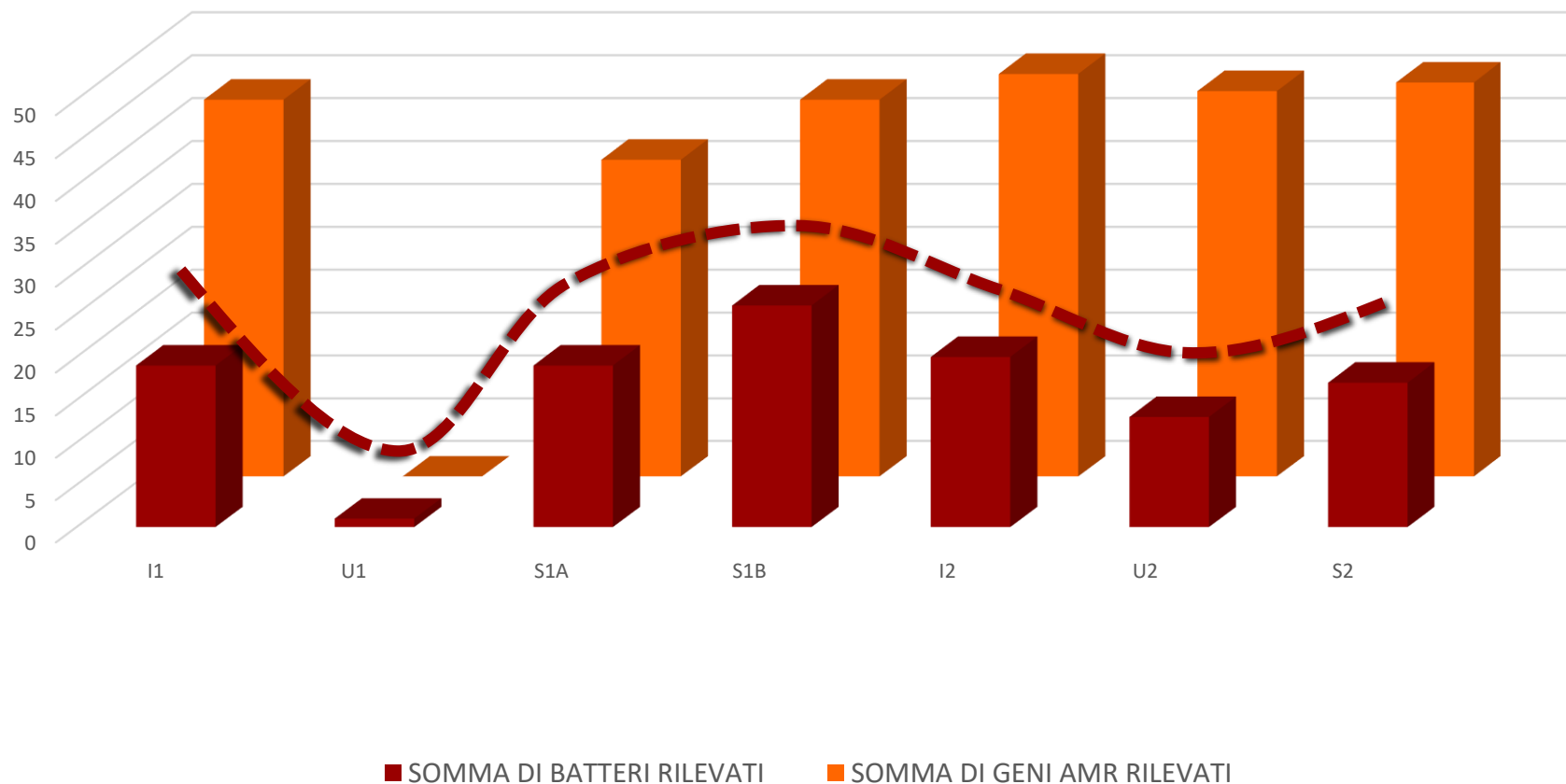
Come funziona un pannello di target enrichment?

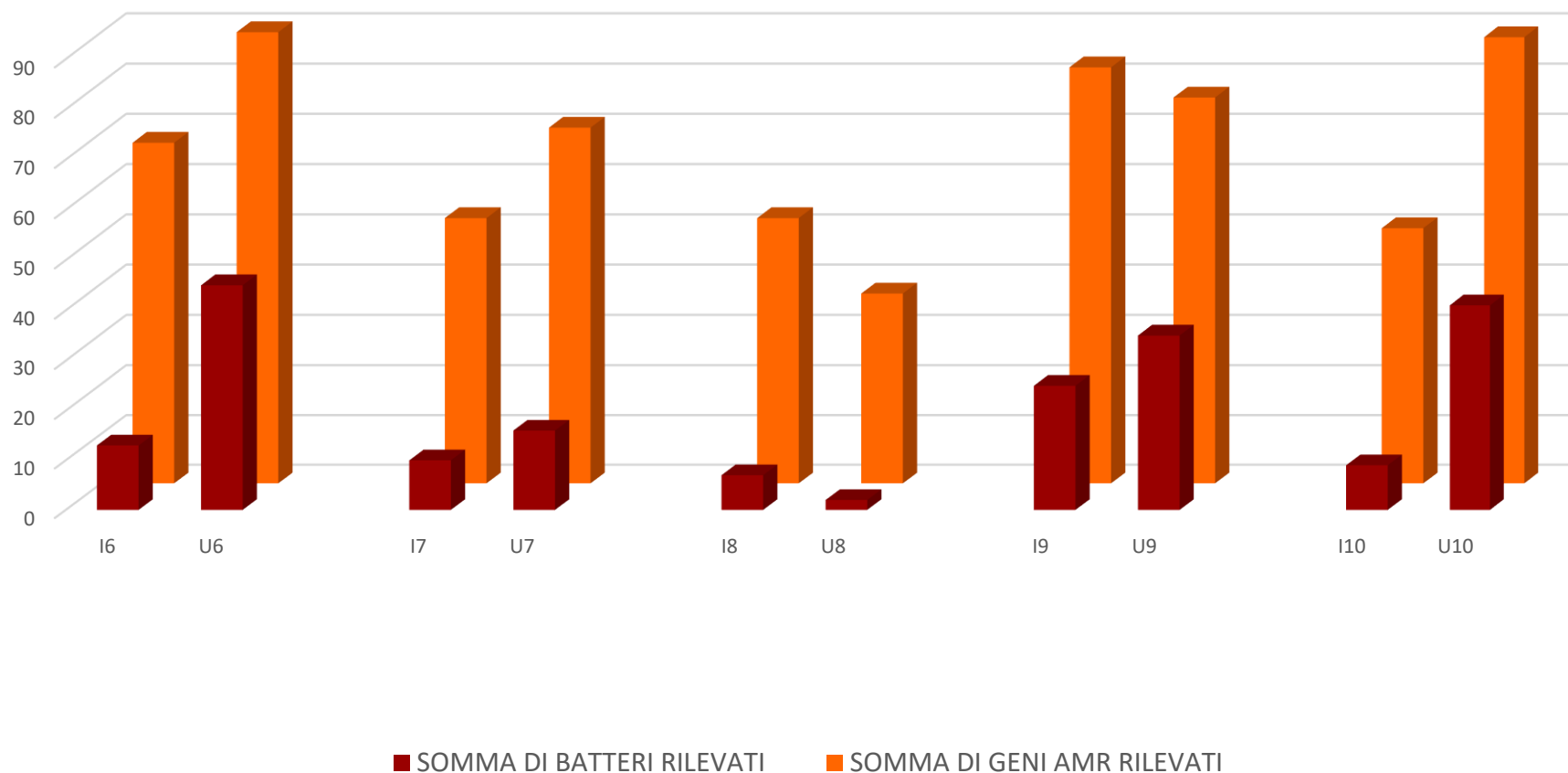


- Studio pilota iniziato nel 2024 sul sequenziamento *targeted* di AMR in acque reflue di 5 depuratori;
- Per ogni depuratore è stato sequenziato il DNA estratto dalle acque in ingresso, in uscita e a valle del depuratore stesso;
- Nel 2024: analisi qualitativa di 5 depuratori;
- Nel 2025: analisi quali/quantitativa di altri 5 depuratori dislocati sul territorio









Risultati: alcuni esempi...

Viruses

Download CSV

Microorganism	Present	Referen... Access...	% Coverage	% ANI	Aligned Reads	Median Depth	RPKM	Absolute Quantity	Phenotypic Group
JC polyomavirus (JCPyV)	✓	-	21.17%	99.69%	10	0	2	8.9×10^3 copies/mL	1

Bacteria

Download CSV

Microorganism	Present	% Co...	% ANI	Ali... Re...	Me... De...	RP...	Absolute Quantity	Phenotypic Group	AMR Found
Escherichia coli	✓	100.00%	99.73%	5.99	86	560	2.2×10^6 copies/mL	3	✓
Bacteroides fragilis	✓	99.92%	99.62%	1.34	52	263	9.7×10^5 copies/mL	2	✓
Klebsiella pneumoniae	✓	99.22%	99.89%	1.08	11	65	2.4×10^5 copies/mL	3	✓
Bifidobacterium breve	✓	96.85%	99.07%	77	3	88	6.8×10^4 copies/mL	2	✓
Pseudomonas putida	✓	95.88%	99.79%	104	5	38	1.5×10^5 copies/mL	3	✓
Enterococcus faecium	✓	83.89%	99.33%	150	3	16	5.4×10^4 copies/mL	3	✓
Hafnia alvei	✓	80.89%	99.59%	18	2	15	8.3×10^4 copies/mL	2	✓
Citrobacter freundii complex	✓	80.23%	98.42%	1.46	4	37	8.0×10^4 copies/mL	3	✓

Bacterial AMR (Genes)

Download CSV

Gene Name	% Coverage	% Identity	Aligned Reads	Median Depth	Confidence	Antimicrobial Class	Associated Microorganisms	Host Found
ACT-73	100.00%	97.11%	125	10	medium	Carbapenem	Escherichia coli	✓
sul2	100.00%	100.00%	8,546	1,190	high	Diaminopyrimidine/Sulfonamide	Escherichia coli	✓
CTX-M-3	100.00%	100.00%	346	47	high	Carboxypenicillin	Escherichia coli	✓
TLA-2	100.00%	99.67%	189	21	medium	Monobactam	Escherichia coli	✓
ANT(6)-Ib	100.00%	100.00%	170	23	high	Aminoglycoside	Bacteroides fragilis	✓
EreB	100.00%	100.00%	290	26	high	Macrolide	Escherichia coli	✓
APH(3'')-Ib	100.00%	99.63%	11,448	1,865	medium	Aminoglycoside	Escherichia coli	✓
aadA11	100.00%	100.00%	13,063	1,247	high	Aminoglycoside	Escherichia coli	✓
OXA-20	100.00%	100.00%	4,944	790	high	Beta-Lactam + Beta-Lactamase Inhibitor	Escherichia coli	✓
QnrS2	100.00%	100.00%	4,729	881	high	Fluoroquinolone	Escherichia coli	✓
AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia	100.00%	100.00%	114	10	high	Aminoglycoside	Klebsiella pneumoniae	✓
APH(3')-VIa	100.00%	99.23%	76	9	medium	Aminoglycoside	Escherichia coli	✓
AER-1	100.00%	99.01%	683	92	medium	Penicillin	Aeromonas hydrophila	✓

1 to 14 of 81 Page 1 of 6

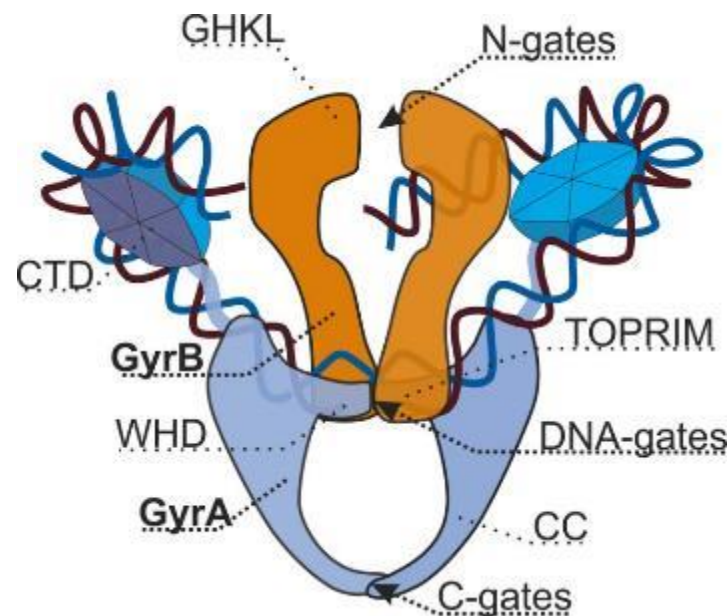
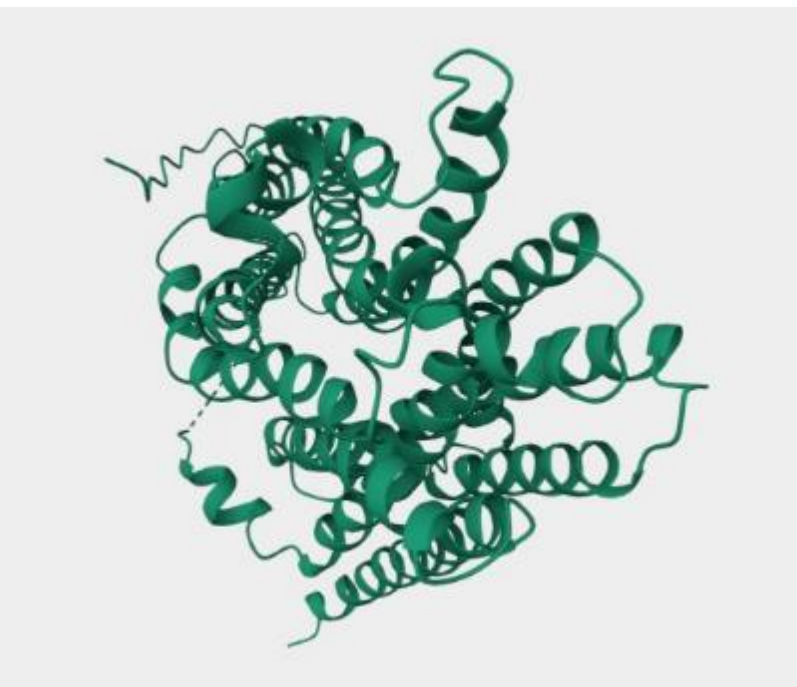
Source: BaseSpace, Dragen Microbial Enrichment Plus
<https://basespace.illumina.com/>

Bacterial AMR (Variants)

Source: BaseSpace, Dragen Microbial Enrichment Plus
<https://basespace.illumina.com/>

Download CSV

Gene Name	Nucleotide Change	Protein Change	Epistatic Groups	Allele Frequency	Median Depth	Antimicrobial Class
GlpT (Escherichia coli)	1342G>A	E448K	N/A	0.80	322	Fosfomycin
gyrA (Pseudomonas aeruginosa)	248C>T	T83I	N/A	0.20	50	Fluoroquinolone



Source: The UniProt Consortium

UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025

Nucleic Acids Res. 53:D609–D617 (2025)

Source: Wikimedia

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gyra_se_structure_Dmitry_Sutormin_eng.png

Le metodiche in biologia molecolare rappresentano il futuro per lo studio e il monitoraggio dell'AMR in ambiente;

Sicuramente i reflui sono un punto chiave per quanto riguarda la creazione, mobilità e la diffusione di ARGs in ambiente e quindi vanno attenzionati da ulteriori studi per trarre delle conclusioni solide.

Grazie per l'attenzione!

Ringrazio tutto il team della microbiologia del Laboratorio di Udine Arpa FVG per il supporto.



Dott.ssa Franchi Marinella (resp.)

Dott.ssa Romina Martinella;
Dott.ssa Anna Perosa
Dott.ssa Sara Vescovo
Dott.ssa Erika Arnoldo
Dott.ssa Antonella Felice
Dott. Marco Minocci
Dott. Sebastiano Muscia

Applicazione del Tricycle Protocol OMS su campioni di acque superficiali

4 settembre 2025

Chiara Suraci - Arpa FVG - SOS Laboratorio per lo studio degli ecosistemi acquatici

Punti campionamento

OMS Tricycle Protocol

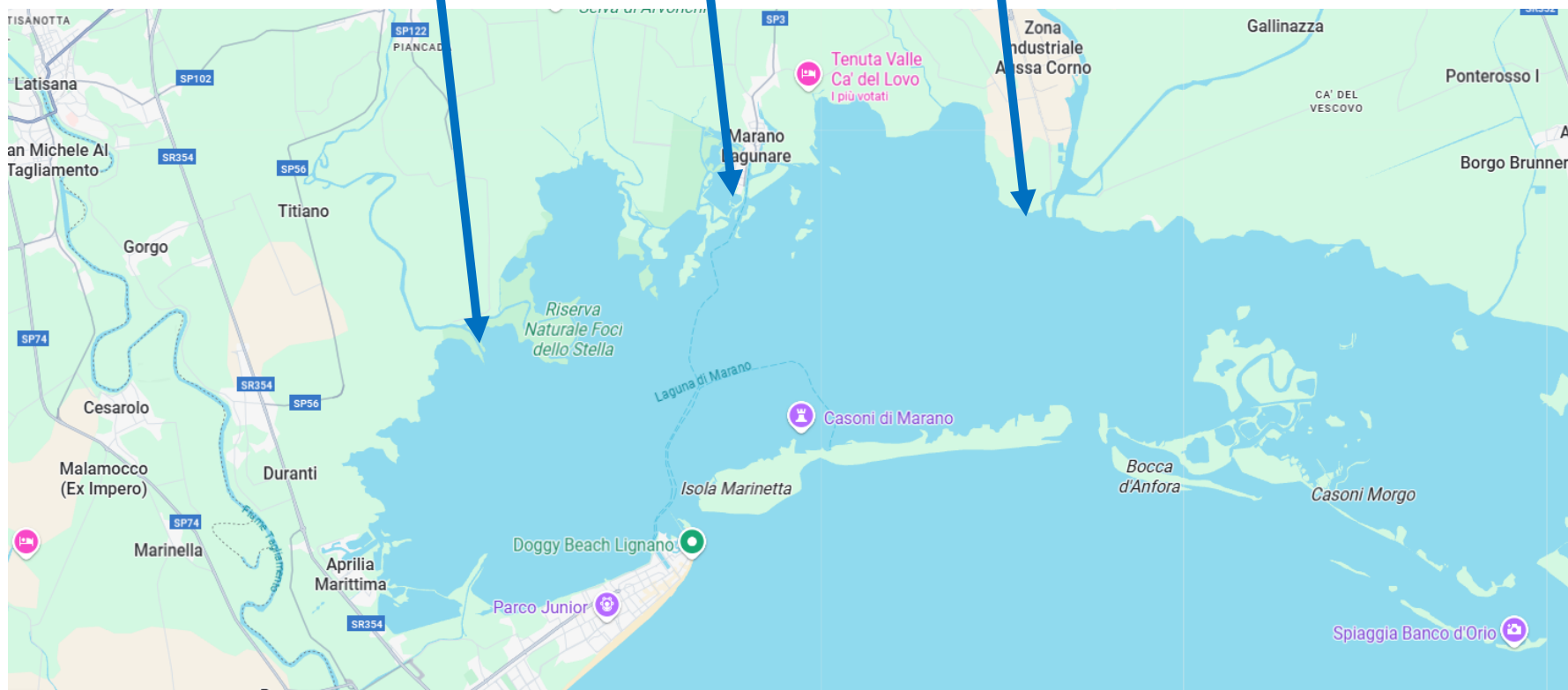
Conferma fenotipica con metodo colturale

Risultati

Foce Cormor

Foce Ausa Corno

Foce Stella





WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One Health” approach: Implementation and opportunities



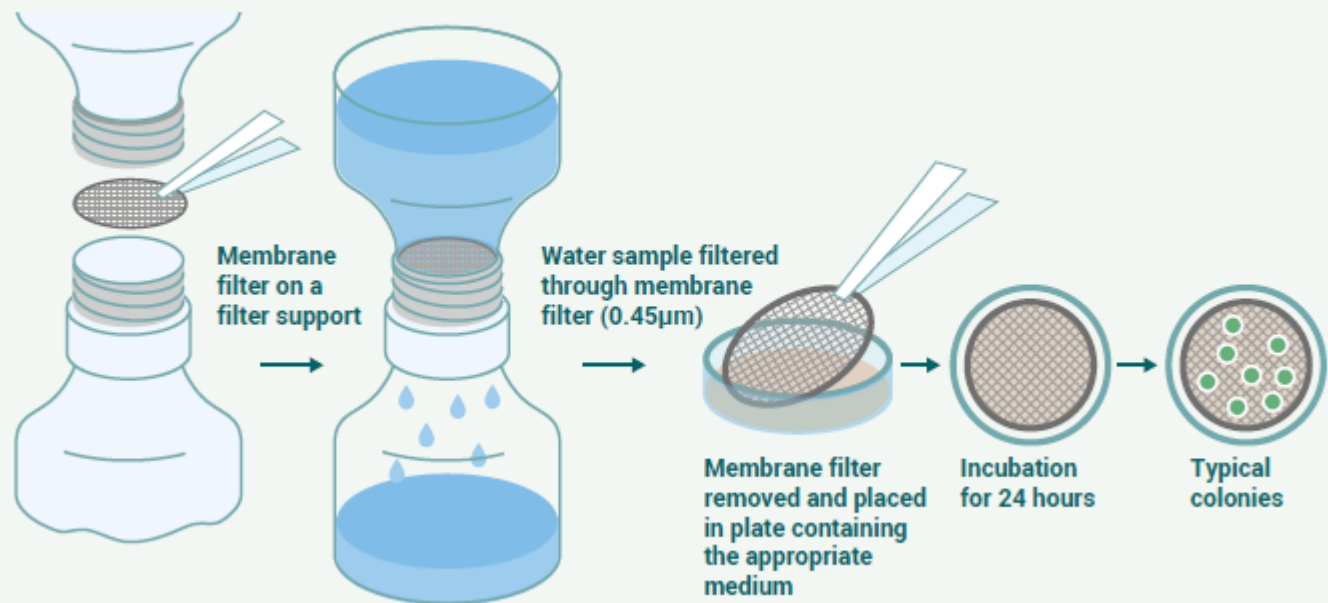
- 4 Methodology by work package
- 4.1 Work package 1: ESBL-Ec in humans
 - 4.1.1 Hospitalized patients
 - 4.1.2 Community (healthy) subjects
 - 4.1.3 Ethical committee
- 4.2 Work package 2: ESBL-Ec in the food chain
 - 4.2.1 Food animal samples
 - 4.2.2 Sampling locations
 - 4.2.3 Animal subject and sample
 - 4.2.4 Number of animal market/slaughter sites, number of samples per site, and temporal frequency of sampling
 - 4.2.5 Microbiological requirements for ESBL-Ec detection and confirmation
 - 4.2.6 Main limitations
- 4.3 Work package 3: ESBL-Ec in the environment
 - 4.3.1 Environmental samples
 - 4.3.2 Site selection
 - 4.3.3 Sampling frequency
 - 4.3.4 Numbers of environmental samples
 - 4.3.5 Microbiological requirements for ESBL-Ec detection and confirmation
 - 4.3.6 Analysis parameters
 - 4.3.7 Metadata
 - 4.3.8 Main limitations

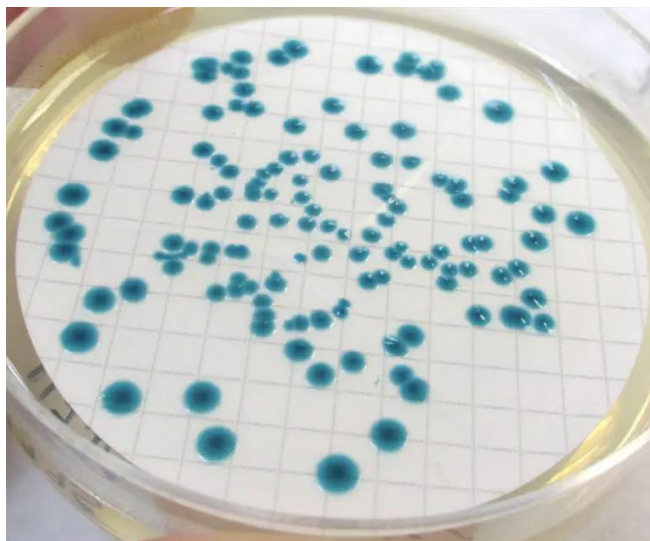
5.3	Annex 3. Work package 3 – ESBL–Ec in water and wastewater: Microbiology procedure	31
5.3.1	Materials and methods	31
5.3.2	Sampling	32
5.3.3	Recommended agars for Tricycle analysis	33
5.3.4	Serial dilutions	33
5.3.5	Materials	33
5.3.6	Procedures	33
5.3.7	Satellite projects: Analysis of drinking water	42
5.4	Annex 4. ESBL confirmatory test	47
5.4.1	Phenotypic confirmation methods	47
5.4.2	Quality control	48
5.5	Annex 5. Reference material for quality control of the microbiological methodologies	49
5.6	Annex 6. Biochemical identification of ESBL–Ec isolates	49
5.7	Annex 7. Media, reagents, and quality control	50
5.7.1	Quality control of media	50
5.7.2	Media preparation	51
5.7.3	Mueller Hinton agar (For ESBL confirmation and antimicrobial susceptibility testing)	53
5.7.4	Reagents	54

Analisi quantitativa di E. coli e E. coli ESBL

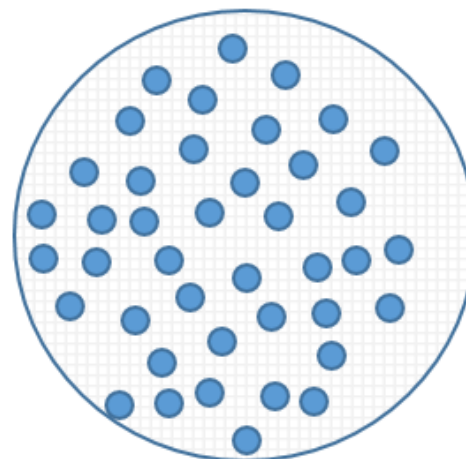


Figure 5.5 Steps of membrane filter procedure

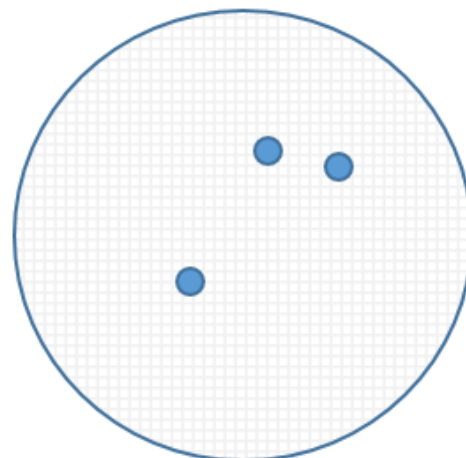




Colonie di Escherichia coli su piastra di
TBX



TBX
Colonie di
E. coli



TBX + CTX
Colonie di
E. coli ESBL

Conferma fenotipica con metodo culturale

Il protocollo OMS fa riferimento ai metodi di conferma fenotipici che possono essere accessibili per la maggior parte dei contesti con risorse limitate, tra cui lo standard EUCAST, seguito dal Laboratorio per lo studio degli ecosistemi acquatici. Il principio dei metodi si basa sulla capacità dell'acido clavulanico di inibire l'ESBL e sulla sinergia che si produce in combinazione con CTX e ceftazidima.

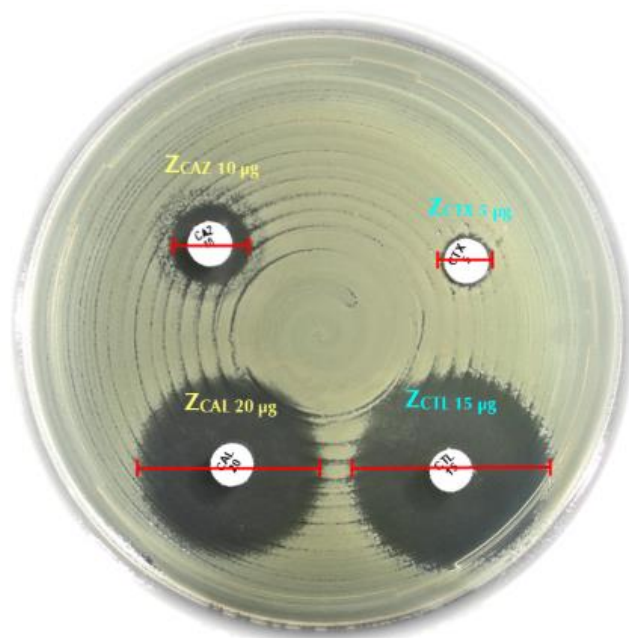
VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Alla fine del periodo di incubazione, misurare gli aloni di inibizione ed interpretare come indicato nella tabella sottostante.

Tabella Interpretativa. Metodo CDT per la conferma di ESBL.

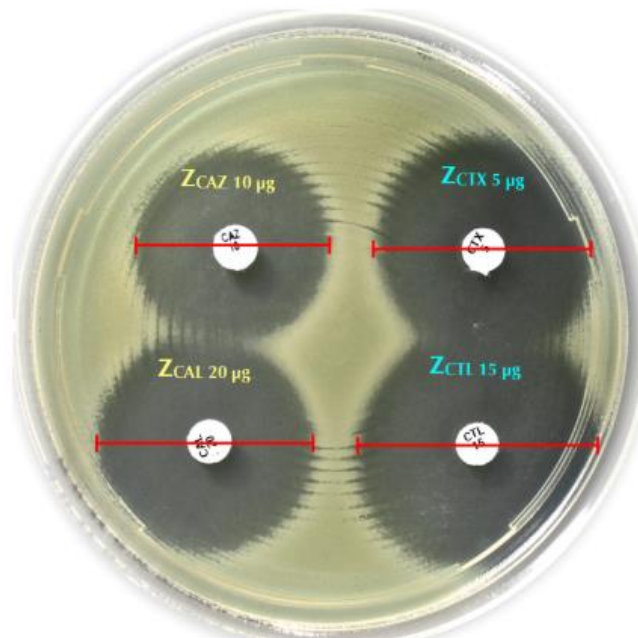
Disco Antibiotico		Test di Conferma positivo se
Cefotaxime da solo e con Acido clavulanico E/O	* CTX 5 µg e CTL 5+10 µg	si osserva un incremento ≥ 5 mm nella zona di inibizione della cefalosporina con l'Acido clavulanico
Ceftazidime da solo e con Acido clavulanico	CAZ 10 µg e CAL 10+10 µg	

ESBL positive strain

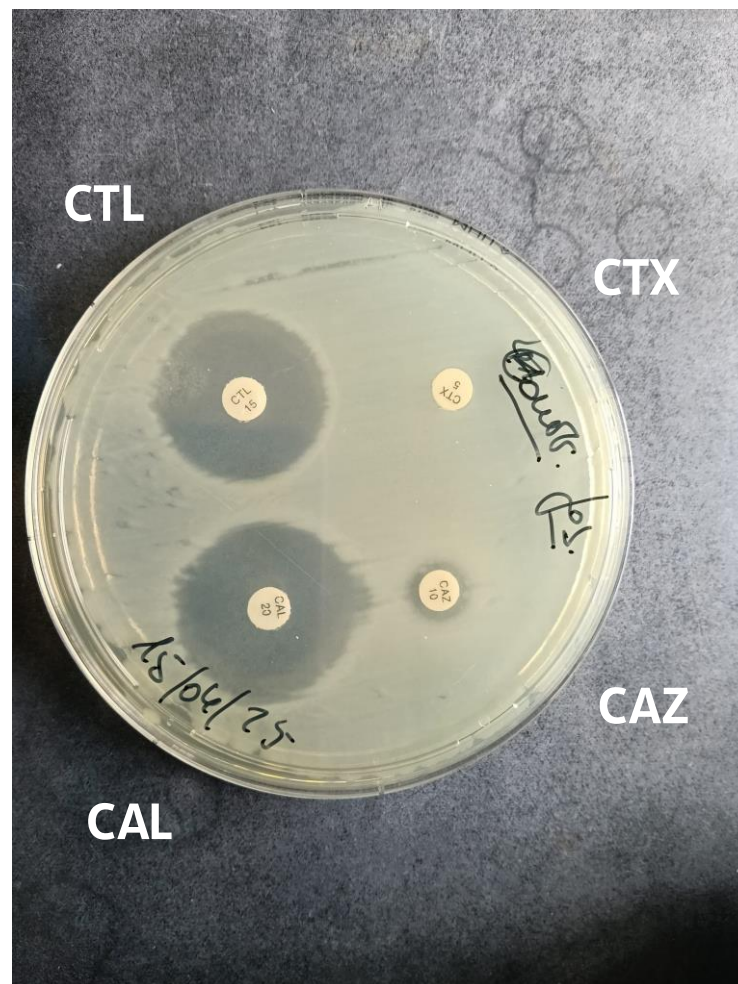
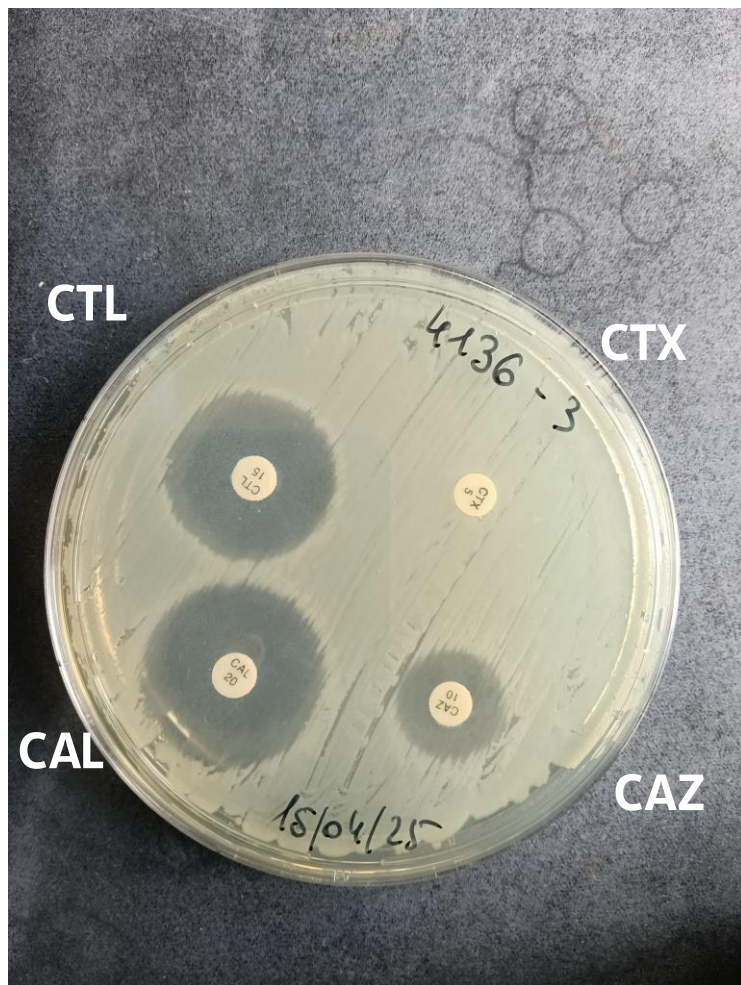


$$\begin{aligned} Z_{CAL\ 20\ \mu g} - Z_{CAZ\ 10\ \mu g} &\geq 5\ \text{mm} \\ Z_{CTL\ 15\ \mu g} - Z_{CTX\ 5\ \mu g} &\geq 5\ \text{mm} \end{aligned}$$

ESBL negative strain



$$\begin{aligned} Z_{CAL\ 20\ \mu g} - Z_{CAZ\ 10\ \mu g} &< 5\ \text{mm} \\ Z_{CTL\ 15\ \mu g} - Z_{CTX\ 5\ \mu g} &< 5\ \text{mm} \end{aligned}$$



CTL = Cefotaxime + Clavulanic acid, **CTX** = Cefotaxime, **CAZ** = Ceftazimidine, **CAL** = Ceftazidime + Clavulanic acid

	CTX 5 µg	CTL 5+10 µg	CTL-CTX	CAZ 10 µg	CAL 10+10 µg	CAL-CAZ	β latt.
15438/2024 colonia 1	0	18	18	20	27	7	pos
15438/2024 colonia 2	7	20	13	15	26	11	pos
15438/2024 colonia 3	10	10	?	10	0	?	dubbia
15438/2024 colonia 4	10	21	11	17	26	9	pos
15438/2024 colonia 5	11	22	11	20	27	7	pos
controllo positivo	/	25	/	8	25	17	ok
controllo negativo	/	25	/	23	23	0	ok

Conferma fenotipica:

NRC 15438/24 colonia 1,

2, 3, 4 e 5; colonia 1, **2**, 4 e

5 R sia per CTX che per

CAZ, colonia 3 risposta

dubbia

Allplex™ Entero-DR Assay

Sample No				
Patient Id			Patient Name	15438/24 c2
Well	[G01]		Data Analysis Time	2024-10-09

- SAMPLE -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
CTX-M	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.36	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.82

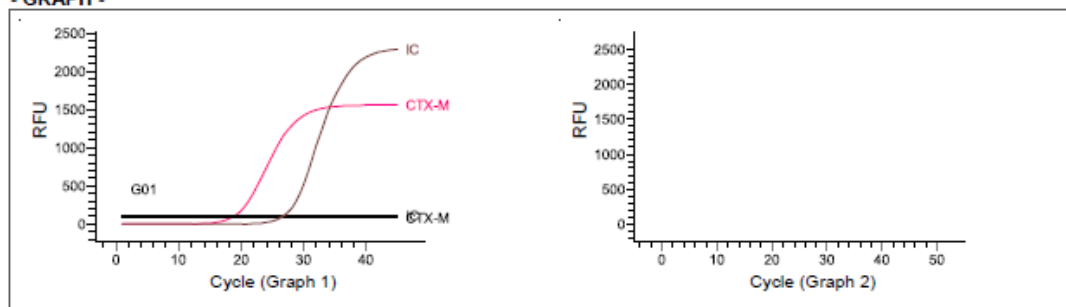
- POSITIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Positive Control(+)	+	20.66	+	19.78	+	19.01	+	19.16	+	17.79	+	18.53	+	19.75	+	18.85	+	19.29

- NEGATIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Negative Control(Invalid)	-	N/A	-	37.25	-	38.66	-	38.25	-	N/A	+	35.83	-	40.36	-	N/A	+	34.04

- GRAPH -





Allplex™ Entero-DR Assay

Conferma fenotipica:

NRC 15438/24 colonia 1,

2, 3, 4 e 5; colonia 1,2, 4

e 5 R sia per CTX che per

CAZ, colonia **3** risposta

dubbia

Sample No							
Patient Id				Patient Name	15438/24 c3		
Well	[H01]			Data Analysis Time	2024-10-09		

- SAMPLE -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
CTX-M, KPC	-	N/A	+	36.97	-	N/A	-	N/A	+	35.42	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.82

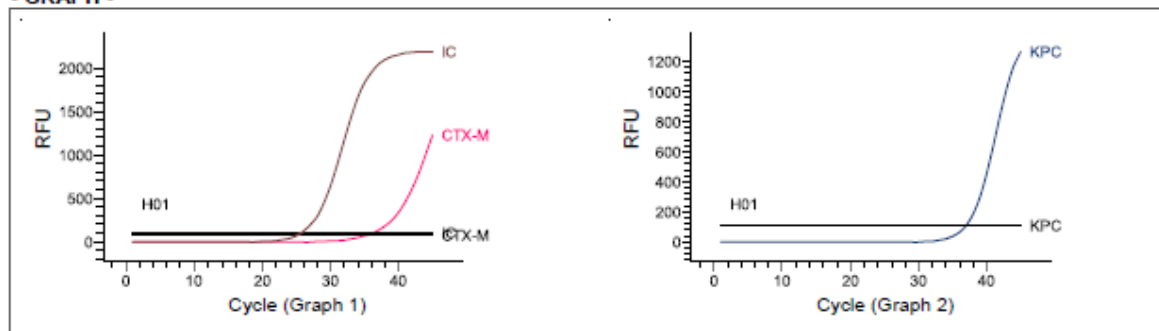
- POSITIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Positive Control(+)	+	20.66	+	19.78	+	19.01	+	19.16	+	17.79	+	18.53	+	19.75	+	18.85	+	19.29

- NEGATIVE CONTROL -

Auto Interpretation	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 705		Quasar 670	
	NDM	C(t)	KPC	C(t)	OXA-48	C(t)	VanA	C(t)	CTX-M	C(t)	VIM	C(t)	VanB	C(t)	IMP	C(t)	IC	C(t)
Negative Control(Invalid)	-	N/A	-	37.25	-	38.66	-	38.25	-	N/A	+	35.83	-	40.36	-	N/A	+	34.04

- GRAPH -



Risultati

	TME 304 (FF Stella Int. Grado)	126 (FF Cormor)	120 (FF Ausa Corno)
08/05/2024			
TBX (ufc/100 ml)	1060	570	360
TBX+CTX (ufc/100 ml)	9	3	7
betalattamasi+	7	3	7
%	0,7	0,5	1,9
10/09/2024			
TBX (ufc/100 ml)	570	500	280
TBX+CTX (ufc/100 ml)	5	3	4
betalattamasi+	4	2	3
%	0,7	0,4	1,1
16/12/2024			
TBX (ufc/100 ml)	450	740	620
TBX+CTX (ufc/100 ml)	8	21	9
betalattamasi+	5	21	8
%	1,1	2,8	1,3
10/03/2024			
TBX (ufc/100 ml)	560	270	1500
TBX+CTX (ufc/100 ml)	2	5	14
betalattamasi+	2	3	14
%	0,4	1,1	0,9

Conclusioni:

- Presenza in basse percentuali di E. coli ESBL in campioni ambientali
- Metodo EUCAST applicabile ma un po' laborioso
- Work in progress ... per ulteriori approfondimenti

Grazie per l'attenzione



SOS Laboratorio per lo studio degli Ecosistemi acquatici

Laura Sidari, Crevatin Erica, Skerlavaj Tatiana, Suraci Chiara