



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione
XXVIII ciclo anno 2013

**IL MICROBIOTA RESIDENTE E
COLONIZZANTE DELLA BILE**

Sapia Genoveffa Francesca

Coordinatore

Prof.ssa Laura De Gara

Tutor

Prof. Giordano Dicuonzo

11 Marzo 2016

INDICE

ABSTRACT	3
CAPITOLO 1.IL MICROBIOTA INTESTINALE	4
1.1 Caratterizzazione del microbiota intestinale	4
1.2 Funzioni del microbiota	8
1.3 Microbiota e interazioni patologiche	9
1.4 Metodiche per lo studio del microbiota	11
1.4.1 La metagenomica	11
1.4.2 Tecnologia MALDI-TOF (matrixassisted laser desorption/ ionisation – time of flight)	15
CAPITOLO 2. INFEZIONI DA <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> MDR	16
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e infezioni nosocomiali	16
CAPITOLO 3. SCOPO DEL LAVORO	20
CAPITOLO 4. MATERIALI E METODI	21
4.1 Campioni ed isolati batterici	21
4.2 Terreni di coltura selettivi e non-selettivi	21
4.3 MALDI-TOF e analisi dei risultati	22
4.4 VITEK 2 SYSTEM COMPACT	24
CAPITOLO 5. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
5.1 Risultati	25
5.2 Discussione dei risultati e conclusioni	33
BIBLIOGRAFIA	35

ABSTRACT

Il mondo del microbiota intestinale in persone sane o malate è ancora oggi un campo di studio molto vasto. L'obiettivo fondamentale della ricerca sul microbiota umano è quello di determinarne la struttura, la dinamica dei rapporti tra i batteri che lo compongono, le sostanze prodotte e consumate, l'interazione tra esso e l'ospite e le differenze nelle persone sane e malate.

Particolare attenzione è stata recentemente prestata alle infezioni da *Klebsiellapneumoniaeresistente* ai carbapenemi (quindi Multi DrugResistant, MDR) susseguenti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE).

Nel nostro policlinico si è sospettato il rischio di un'epidemia di *K. pneumoniae* MDR nel 2012-2013 con il susseguirsi di possibili casi sporadici.

Nel nostro laboratorio è stato effettuato uno studio epidemiologico su 25 ceppi di *Klebsiellapneumoniae*, il cui risultato ha evidenziato il passaggio epidemiologico tra due pazienti.

Partendo dall'evidenza del rischio di outbreak di KPC in seguito a CPRE e sulla base delle nozioni acquisite sul microbiota intestinale, abbiamo deciso di voler studiare il microbiota residente o colonizzante la bile utilizzando le tecniche "cultuomics", oggi giorno sempre più di supporto alle analisi metagenomiche.

Lo studio è stato eseguito su 77 campioni di bile prelevata in sede intra-operatoria da pazienti ricoverati presso il reparto di Chirurgia generale del Policlinico Campus Bio-medico di Roma, tra gennaio 2014 e gennaio 2016.

61 campioni sono risultati positivi alla coltura in piastra. Su 168 isolati identificati, 87 erano Gram positivi, 67 Gram negativi e 14 funghi lievitiiformi.

50 isolati hanno mostrato particolari resistenze agli antibiotici (tra questi 6 KPC).

L'analisi dei dendogrammi degli spettri proteici ottenuti tramite MALDI-TOF MS mette in evidenza la precisione dello strumento che divide perfettamente gli isolati in clusters differenti a seconda della specie e delle resistenze antibiotiche.

CAPITOLO 1

IL MICROBIOTA INTESTINALE

1.1 Caratterizzazione del microbiota intestinale

L'insieme dei microrganismi in un particolare habitat è chiamato microbiota.

I genomi collettivi di tutti i microrganismi in un microbiota sono definiti microbioma (1).

Con il termine microbiota intestinale si intende l'insieme di batteri che colonizzano l'intestino umano (2). Il numero di batteri presenti all'interno dell'intestino è 10 volte maggiore del numero di cellule che compongono il corpo umano (3) con un numero di specie che può variare da 500 fino a 1000. (4) L'intestino umano rappresenta, quindi, un sistema in cui triliardi di batteri convivono ed interagiscono con l'organismo ospite, rappresentando in qualche modo un "organo metabolico" capace di influenzare la regolazione di molte funzioni organiche, di contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete tipo 2, aterosclerosi) (5-7).

Molti sostengono che l'essere umano nasca con un intestino sterile. Studi recenti, invece, dimostrano che la colonizzazione del tratto gastrointestinale inizia prima della nascita, con l'ingestione da parte del feto del liquido amniotico contenente batteri. L'instaurarsi del microbiota intestinale è un processo complesso e influenzato da diversi fattori tra cui la differenza tra parto naturale e cesareo. Già durante il primo mese di vita si ha la colonizzazione da parte di batteri aerobi e anaerobi facoltativi, seguiti dagli anaerobi obbligati e dai bifidobatteri, il tutto condizionato dal tipo di allattamento (al seno materno o artificiale). Il primo anno di vita è fondamentale per lo sviluppo del microbiota, che si accresce e si seleziona fino al quarto anno di età (8-10).

Nei bambini fino al settimo anno di età è presente un maggior numero di enterobatteri rispetto a quello trovato negli adulti (11-12). Il microbiota intestinale adulto resta relativamente stabile nel tempo (13), per poi variare in età geriatrica quando si ha una riduzione sia del numero di batteri che delle specie in esso presenti (14).

La composizione del microbiota, quindi, evolve durante la vita, dalla nascita alla vecchiaia, ed è il risultato di diversi fattori ambientali. Un terzo del microbiota è comune alla maggior parte degli individui, mentre due terzi sono specifici per ognuno (7). Nonostante questo, sembra che ci sia un equilibrio generale che conferisce benefici per la salute (15).

La quantità di batteri presenti nei diversi tratti dell'intestino non è omogenea. Infatti, il numero di cellule batteriche varia da 10^0 - 10^3 batteri per grammo nello stomaco e nel duodeno, da 10^4 a 10^7 batteri per grammo nel digiuno e da 10^{11} - 10^{12} cellule per grammo nel colon (16) fig.1.

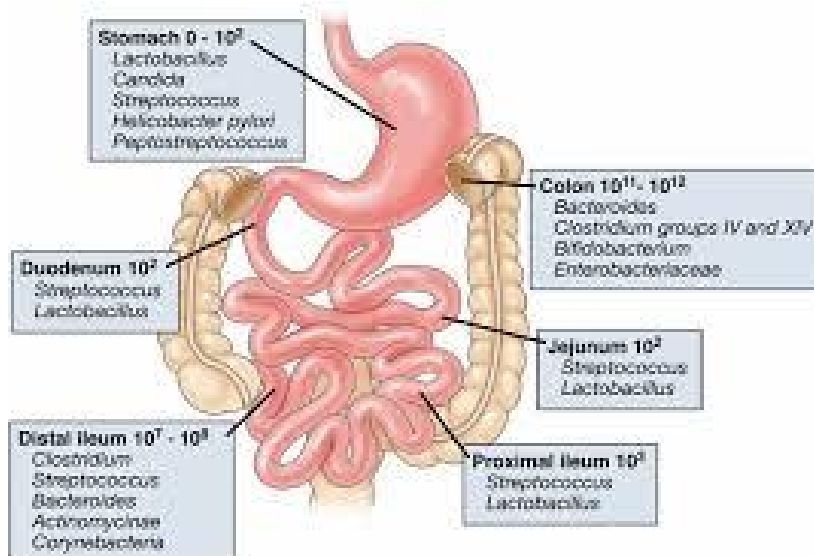


Fig.1: Composizione e concentrazioni luminali delle specie microbiche dominanti nelle differenti regioni del tratto gastrointestinale umano

Ad iniziare dalla cavità orale osserviamo principalmente anaerobi come *Prevotella*, *Peptostreptococchi*, *Bacteroidi*, *Fusobacteri ed Eubacteri*. La popolazione batterica è scarsa nello stomaco a causa del pH estremamente acido ivi presente.

Il duodeno ha una bassa popolazione microbica, ciò è dovuto al veloce tempo di transito, alla secrezione di fluidobiliari e pancreatici che uccidono la maggior parte di batteri ingeriti, e per l'effetto dell'attività motoria propulsiva che impedisce la colonizzazione stabile del lume. Con il progressivo aumento del numero delle specie dal digiuno all'ileo, cominciano ad aumentare i Gram negativi e gli anaerobi obbligati. Gli anaerobi sono particolarmente abbondanti nel cieco e nel colon destro a causa della grande disponibilità di substrati e del favorevole ambiente per la crescita batterica (basso tempo di transito, disponibilità pronta di nutrienti, pH favorevole etc.) (17-18).

Negli adulti i phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (fig.:2) di solito sono quelli più abbondanti (19), mentre *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* sono in genere costituenti minori del microbiota intestinale (20) fig.2. Numerosi generi appartengono al phylum *Firmicutes*, nel colon ritroviamo principalmente i cluster IV e XIV del genera *Clostridia*, tra cui rispettivamente *Eubacterium* e *Faecalibacterium*, e *Roseburia* e *Ruminococcus*. Nel phylum *Bacteroidetes* i generi maggiormente rappresentati nell'intestino sono *Bacteroides* e *Prevotella*. Mentre il *Bifidobacterium* è il genere prevalente del phylum *Actinobacteria* (21). La eterogeneità degli Archea metanogeni è limitata a due sole specie *Methanobrevibacter smithii* e *Methanobrevibacter stadtmanae* (22).

Gli eucarioti (soprattutto i lieviti) e i virus (principalmente fagi) sono normalmente presenti nell'intestino, anche se in minima percentuale (23). I virus rappresentano un ulteriore ed importante costituente del microbiota intestinale umano come indicato da studi recenti che riportano l'identificazione, nelle feci umane, di più di 1200 genotipi virali con una densità fino a 10^9 virioni/g di materiale secco (24), e di batteriofagi nella mucosa di soggetti sani e affetti da malattie infiammatorie intestinali (IBD).

I batteriofagi esercitano una forte influenza sulla diversità batterica e sulla struttura della popolazione, e probabilmente sono coinvolti in fenomeni di disbiosi, destabilizzando le comunità batteriche (25). Recentemente, Lepage et al. (26) hanno misurato la comunità virale totale associata alla mucosa intestinale in individui sani ed in pazienti affetti da morbo di Crohn. Mediante microscopia ad epifluorescenza, sono state osservate particelle virus-simili (VLP) con una media di 1.2×10^9 VLP per campione biotico (4.4×10^7 - 1.7×10^{10} , 1010/mm³ di tessuto). Particelle virali

corrispondenti a batteriofagi con morfotipi di Siphoviridae, Myoviridae e Podoviridae, sono risultate dominanti, ed ogni individuo è apparso colonizzato da un'unica famiglia fagica prevalente.

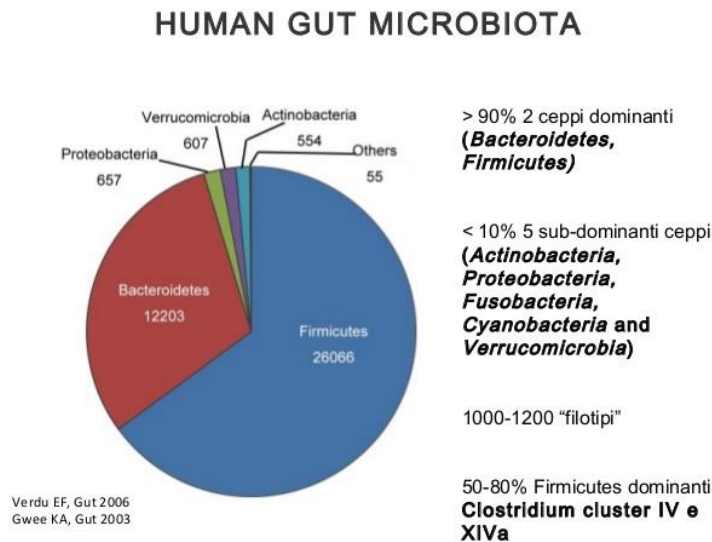


Fig.2: distribuzione dei diversi generi che compongono il microbiota umano

1.2. Funzioni del microbiota intestinale

L'obiettivo fondamentale della ricerca sul microbiota umano è quello di determinarne la struttura, la dinamica dei rapporti tra i batteri che lo compongono, le sostanze prodotte e consumate, l'interazione tra esso e l'ospite e le differenze nelle persone sane e malate (27). Il microbiota ha una profonda influenza sulla fisiologia dell'organismo, sulla nutrizione e risulta cruciale per la salute dell'ospite.

Le funzioni metaboliche del microbiota intestinale comprendono la produzione delle vitamine, la sintesi degli aminoacidi e la biotrasformazione degli acidi biliari attraverso enzimi che hanno implicazioni importanti per il metabolismo del colesterolo e del glucosio. Inoltre, ha azione barriera e fornisce percorsi biochimici necessari per la fermentazione dei substrati non digeribili e del muco endogeno (28).

La fermentazione di residui alimentari non digeribili e di muco endogeno prodotto dall'epitelio è la principale fonte di energia nel colon. Nel cieco e nel colon destro la fermentazione è molto intensa con una elevata produzione di acidi grassi a catena corta (short chain fatty acids SCFA: acetato, propionato, butirato in rapporto 60:25:15). Gli SCFA hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospite sono la fonte principale di energia per l'epitelio del colon, vengono metabolizzati dal fegato e dai tessuti periferici, e possono avere un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo (29,30,31). I batteri che producono SCFA sembrano influenzare il ciclo degli enterociti nel colon; in particolare il butirato inibisce la proliferazione cellulare, stimola la differenziazione nelle linee cellulari neoplastiche epiteliali in vitro e promuove il ritorno da fenotipo neoplastico a non neoplastico (32-33).

La idrossilasi batterica partecipa nel colon alla scissione di sali biliari, formando acidi biliari primari e secondari, e partecipa al loro riassorbimento enteroepatico (34). Acidi grassi a catena corta, come il butirato, possono anche esercitare effetti immunomodulatori potendosi opprimendo l'attivazione del fattore nucleare κB e/o agendo sui recettori accoppiati a G-protein (35,36). I microrganismi del colon svolgono anche un ruolo nella sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, PP, H,

acidopantotenico e folico) e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, questo ruolo è ulteriormente migliorato dalla presenza di acidi grassi a corta catena (37).

I batteri residenti sono una linea fondamentale di resistenza alla colonizzazione da parte di microbi esogeni. Essi regolano attivamente la produzione di nutrienti da parte dell'ospite tramite un meccanismo di feedback negativo, al fine di prevenire la disponibilità di nutrienti per potenziali patogeni (38,39). Inoltre, competono per i siti di attacco sull'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali così da inibire la crescita di loro concorrenti patogeni, attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche chiamate batteriocine (40,41).

La mucosa intestinale rappresenta l'interfaccia principale tra il sistema immunitario e l'ambiente esterno, e la collaborazione tra l'ospite e i batteri sembra giocare un ruolo nello sviluppo del sistema immunitario (42).

Inoltre, segnali dai batteri intestinali appaiono importanti per lo sviluppo della regolazione dei linfociti T helper di tipo 1 e 2 (43,44,45). La prima molecola di un microrganismo commensale che ha dimostrato influenza benefica sulla risposta immunitaria è stato il polisaccaride capsulare A, prodotto dal *Bacteroides fragilis* (46).

1.3 Microbiota e interazioni patologiche

Ci sono studi che mettono in evidenza come le specie che colonizzano l'intestino di persone sane cambino in corso di patologie e/o di processi infiammatori (47).

La flora intestinale sembra essere un fattore ambientale capace di influenzare il metabolismo e l'omeostasi energetica dell'ospite, essendo anche coinvolta nel controllo del peso corporeo attraverso l'estrazione di una quota supplementare di calorie dagli alimenti ingeriti (48).

Ad esempio, uno studio danese effettuato su 123 individui normopeso e 169 obesi, mostra come ci sia una differenza nella composizione del microbioma e nella quantità delle popolazioni batteriche presenti. Le persone con una bassa concentrazione batterica intestinale (23% della popolazione esaminata) sono caratterizzate da una marcata adiposità localizzata, insulino-resistenza, dislipidemia e notevoli processi infiammatori. Gli obesi con bassa concentrazione batterica acquistano più peso nel

tempo rispetto alle persone magre con simile popolazione batterica. Bastano poche specie microbiche per distinguere tra persone con una bassa/alta concentrazione batterica, fattore che può essere predittivo di rischio di obesità (49). A conferma di ciò, in un altro studio si è osservato che topi germ-free/axenici, sono più magri (40% di grasso corporeo in meno e 47% di grasso gonadico in meno) rispetto ai topi che vivono con flora intestinale normale, anche se questi ultimi hanno mangiato circa il 30% in meno rispetto ai topi axenici. Il trapianto di batteri provenienti dal cieco di topi magri nei topi axenici induce un drammatico aumento di peso corporeo (massa grassa corporea totale) entro due settimane, senza che vi sia stato un aumento nell'assunzione del cibo (50). Questo aumento della massa grassa è ancora più evidente quando la comunità microbica intestinale deriva da topi geneticamente obesi (ob-ob) (51).

Questi risultati sono verosimilmente dovuti alle differenze nel microbiota e/o nei metaboliti da esso derivati dei topi magri/obesi.

È stato dimostrato che i topi obesi presentano un maggior rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* nel microbiota del cieco rispetto a quello di topi magri (52). La complessità della flora batterica intestinale è stata studiata per individuare eventuali specie specifiche in rapporto al differente stato di nutrizione. Tuttavia nonostante siano stati effettuati studi osservazionali in individui obesi (53) o anoressici (54), esistono risultati contrastanti. La somministrazione di inulina ad esempio, provoca l'aumento del *Faecalibacterium prausnitzii* in volontari sani (55), e la presenza di quest'ultimo, a sua volta, riduce l'infiammazione e il diabete in soggetti obesi (56). Invece, il genere *Lactobacillus* spp, appartenente al phylum Firmicutes, pare sia collegato all'obesità (57,58-61). Fino ad oggi, il dibattito rimane irrisolto, ma è probabile che alcune specie siano protettive contro l'obesità, mentre altre specie siano associate a un aumento di peso.

La variazione della flora microbica intestinale risulta essere notevole in diversi tipi di patologie autoimmuni tra cui celiachia, la colite ulcerosa e il morbo di Crohn. Nei pazienti celiaci si osserva una riduzione dei Bifidobatteri, di *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lituseburense* e *F. prausnitzii*, aumenta invece la quantità di *Bacteroides* e *Prevotella*.

Nei pazienti affetti da morbo di Crohn si ha un maggior numero di *Enterococcuspp.*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Shighellaflexneri* e *Listeria* rispetto a persone sane (62).

C'è un'aumentata considerazione del fatto che il microbiota fa parte di un complesso network multidirezionale con il cervello, network che viene definito assemicrobiota intestinale-cervello. In persone affette da stress, da depressione o disturbi del comportamento si è evidenziata un alterazione del microbiota rispetto alla norma. L'utilizzo di microrganismi potrebbe far parte di un nuovo tipo di piano terapeutico (63).

1.4 Metodiche per lo studio del microbiota

La descrizione completa del microbiota umano e il suo rapporto con la salute e la malattia si sono già dimostrati una delle principali sfide nel XXI° secolo. In effetti, l'elenco delle pubblicazioni per anno su tale argomento si è espanso notevolmente nell'ultimo decennio.

Il primo approccio utilizzato per lo studio del microbiota umano è stato la coltura batterica, mentre recentemente essa è stata sostituita dal sequenziamento genico di tutte le operationaltaxonomicunits (OTU) definite attraverso la metagenomica.

1.4.1 Lametagenomica

La metagenomica (l'analisi dei genomi di gruppi di batteri presenti in uno stesso ambiente) è una branca della genomica che studia simultaneamente una comunità complessa di microrganismi presenti in un campione. (64). La metagenomica si è avvalsa dell'utilizzo di sequenze di rRNA 16S per identificare i diversi ceppi batterici. La sequenza genica del 16S rRNA (circa 1,500 bp) è stata da sempre usata per lo studio della tassonomia e della filogenesi delle diverse specie batteriche in quanto la sua funzione non è mutata nel tempo. Il suo utilizzo in questo campo ha permesso di individuare la presenza di specie non descritte, strettamente connesse a quelle note e di altre specie o generi con lontana parentela con batteri noti. Il gene

ribosomiale 16SrRNA, rappresentato in fig. 3, è costituito da 10 regioni conservate e da 9 regioni ipervariabili, è sottoposto a un basso tasso di evoluzione ed è presente in tutti i batteri. A causa delle restrizioni cui è soggetta la struttura dell'rRNA, come conseguenza del fatto che deve assumere una struttura secondaria definita e deve interagire con diverse proteine per formare un ribosoma funzionale, il tasso di variazione delle sequenze dei geni che codificano per l'rRNA è di gran lunga inferiore a quello degli altri geni, di conseguenza è possibile determinare le relazioni filogenetiche su ampie distanze evolutive. Questo tipo di RNA funziona, quindi, come un orologio molecolare e consente accurate determinazioni delle distanze filogenetiche.

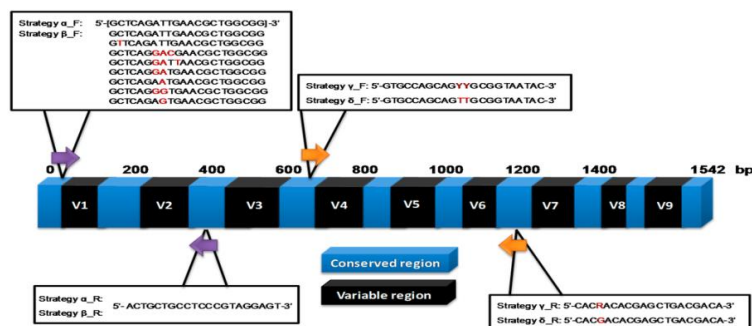


Fig.3: Gene 16S rRNA

Il prodotto genico del 16S rRNA è una regione che costituisce la subunità minore 30S dei ribosomi dei procarioti (65).

La scelta dell'uso del gene 16S rRNA come marcatore filogenetico per esaminare la diversità microbica per identificare e classificare i microrganismi nasce dalla difficoltà nella coltivazione della maggior parte dei microrganismi presenti in ambienti naturali (66).

Da quando Lane *et al.* (1985) per primi hanno descritto l'uso del gene 16S rRNA per l'identificazione e la classificazione dei microrganismi non coltivabili dell'ambiente, l'amplificazione mediante PCR, il clonaggio e il sequenziamento sono state le tecnologie primarie usate per identificare i procarioti provenienti da vari ecosistemi. Ad oggi sono state depositate in un database circa 3 milioni di sequenze batteriche e

54 mila sequenze di Archea della regione 16S (RDP Release 11, Update 3, settembre 2014 <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

L'analisi metagenomica ha indicato che i batteri fecali coltivabili rappresenterebbero solo una frazione di quelli effettivamente presenti nell'intestino, è accertato che la diversità della flora intestinale fecale è considerevolmente maggiore, circa l'80% non sarebbe coltivata e non sarebbe coltivabile, molto probabilmente a causa delle particolari esigenze di crescita.

Il consorzio MetaHIT ha pubblicato un primo documento che descrive l'insieme dei dati di metagenomica, ottenuti utilizzando la tecnologia di sequenziamento Illumina, contenente più di 200 sequenze del microbiota intestinale ottenute da campioni fecali di 124 individui europei, tra adulti sani, sovrappeso, obesi e pazienti con malattia infiammatoria intestinale (IBD) (67). L'analisi funzionale ha identificato un insieme di geni che sembrano essere essenziali per la sopravvivenza dei batteri nell'intestino. Questi includono geni housekeeping tipici e geni che possono codificare per prodotti coinvolti nell'adesione alle proteine o nella raccolta degli zuccheri che si trovano nel sangue nelle cellule epiteliali. I geni che codificano per queste funzioni possono essere essenziali per il funzionamento dell'ecosistema microbico intestinale nel suo complesso, ma possono essere codificati da differenti specie batteriche. Oggigiorno, il sequenziamento dei geni del microbioma intestinale viene effettuato attraverso l'utilizzo del pyrosequencing che permette di identificare le differenti specie batteriche presenti nei campioni con una sensibilità maggiore.

Un lavoro recente, mediante la tecnica del pyrosequenziamento, ha catalogato tutte le specie batteriche, anche quelle non coltivabili, delle feci di bambini sani di età dagli uno ai sei anni che vivono in un villaggio rurale africano in Burkina Faso, le cui condizioni di vita sono molto simili a quelle dell'uomo del Neolitico al momento della scoperta dell'agricoltura e dell'allevamento. La dieta di questi bambini è prevalentemente vegetariana, composta soprattutto da miglio, sorgo e vegetali. I risultati sono stati quindi confrontati con quelli ottenuti da una popolazione di bambini della stessa età che vivono a Firenze e che hanno una dieta tipicamente occidentale. I bambini del Burkina Faso presentano un microbiota con maggiore biodiversità, ricco di batteri che sono in grado di digerire la cellulosa, i quali, come controparte sono in grado di restituire come prodotto finale composti benefici per il nostro intestino

quali il butirrato, unpotente antinfiammatorio naturale. Inoltre, nonostante questi bambini vivano in condizioni igienicheprecarie e siano soggetti a un tasso elevato di malattie infettive, presentano un ridotto numero dibatteri potenzialmente patogeni quali *E. Coli*, *Shigella*, *Salmonella* che sono presenti nelle feci deibambini fiorentini. Il microbiota dei bambini fiorentini invece è caratterizzato da specie batteriche chesono state spesso ritrovate negli obesi (68).

Tutte insieme le tecnologie Next Generation Sequencing hanno semplificato la strategia di sequenziamento, ridotto gli artefatti, aumentato la velocità alla quale può essere sequenziato un genoma e ridotto il costo di sequenziamento di molti ordini di grandezza, permettendo così di analizzare molti più campioni.

Dall'altra parte però troviamo anche per queste tecnologie all'avanguardia degli svantaggi e delle limitazioni che non ne permettono l'uso per ogni tipo di campione. Il primo punto a sfavore è la produzione di sequenze corte, questo implica la produzione di errori dal momento che nel genoma si incontrano sequenze ripetute e si ha la necessità di aumentare la copertura per assicurarsi di non compiere errori. Altra questione è la costruzione delle librerie; sebbene sia stata superata la fase di clonaggio con la produzione di librerie a inserto variabile, esistono ancora dei passaggi fondamentali, quali: frammentazione, legame con adattatori, purificazione, amplificazione PCR, durante i quali è possibile l'introduzione di errori. Altre limitazioni sono gli errori e gli artefatti durante il sequenziamento o l'utilizzo di software non sempre appropriati (66). Ad esempio, la metagenomica manca spesso dell'identificazione dialcuni potenziali patogeni come *Salmonella typhi*, *Tropherymawhipplei* e *Yersinia enterocolitica* (69).In più, c'è da dire che le tecniche di metagenomica non riescono ad identificare batteri la cui concentrazione all'interno del campione è inferiore a 10^5 (70).

In seguito a queste osservazioni, negli ultimi tempi si è riscoperto un marcato interesse per il classico metodo delle colture batteriche da identificare però, attraverso la spettrometria di massa che può rapidamente identificare i microrganismi misurando, in maniera estremamente accurata, il peso molecolare delle macromolecole e in base al rapporto massa/carica (71).

1.4.2 Tecnologia MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry)

La spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF (matrixassisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry) è stata recentemente introdotta nei laboratori di microbiologia come metodo rapido, accurato ed economico per l'identificazione di batteri, micobatteri, lieviti e funghi. Questa tecnologia costituisce un'alternativa valida e interessante ai metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare ed è applicabile in differenti aree della diagnostica clinica e della ricerca.

Dal punto di vista organizzativo l'utilizzo del MALDI-TOF migliora notevolmente i tempi e la modalità di refertazione poiché il laboratorio è in grado di comunicare al clinico la specie dell'isolato batterico entro pochi minuti dal riscontro colturale, con un anticipo di 24 ore rispetto all'impiego dei test biochimici tradizionali. Soprattutto in casi clinicamente difficili la segnalazione tempestiva del dato microbiologico può definire la diagnosi e suggerire una terapia antibiotica mirata ed efficace. L'impiego della spettrometria di massa per l'identificazione diretta delle specie microbiche da coltura è soltanto una delle possibili applicazioni di questa tecnologia nei laboratori clinici; recenti pubblicazioni scientifiche ne propongono infatti l'utilizzo per l'identificazione di germi patogeni direttamente da campione clinico (emoculture e altri materiali sterili) e per lo screening rapido di importanti meccanismi di antibiotico-resistenza (meticillino-resistenza; vancomicina-resistenza; produzione di β -lattamasi a spettro esteso) (72).

Il gruppo di Didier Raoult ha combinato l'approccio della spettrometria di massa con gli altri metodi noti e non- per permettere alla "culturomics" di essere il principale complemento per la metagenomica nello studio del microbioma intestinale (73).

CAPITOLO 2

INFEZIONI DA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* MDR

2.1 Klebsiellapneumoniae e infezioni nosocomiali

Particolare attenzione è stata recentemente prestata alle infezioni da *Klebsiellapneumoniae* resistente ai carbapenemi (quindi Multi DrugResistant, MDR) susseguenti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE).

La CPRE è una tecnica che consente la visualizzazione radiografica del dotto pancreatico e dei dotti biliari da parte del mezzo di contrasto iniettato per via endoscopica (74).

K. pneumoniae è un commensale del tratto intestinale, normalmente presente nel colon e non rappresenta un pericolo per la salute dell'uomo ma è considerato un patogeno opportunisto che in alcune condizioni è in grado di causare gravi infezioni. Colonizza prevalentemente pazienti immunocompromessi e le infezioni gravi di cui si rende responsabile sono generalmente polmoniti; mentre nei casi nosocomiali sono più frequenti le infezioni del tratto urinario, gastrointestinale e delle ferite chirurgiche (75-76).

È un batterio Gram-negativo, di forma bastoncellare, immobile, rivestito da una capsula polisaccaridica ciliata. Sulla superficie della cellula batterica sono esposte molecole di lipopolisaccaride (LPS), caratteristica comune di tutti i batteri Gram-negativi. Questa molecola rappresenta un'endotossina e conferisce proprietà tossiche. Ha una componente lipidica il *lipide A*, il *core polisaccaridico* e una porzione polisaccaridica esterna, denominata antigene *O*(77).

Alcuni studi hanno valutato che generalmente nei pazienti non ospedalizzati il tasso di isolamento di *K. pneumoniae* nelle feci è del 38% e del 6% nella mucosa del tratto respiratorio, mentre non sono frequenti isolamenti della specie dalla cute, dove il germe non trova le condizioni ideali per la colonizzazione. Queste percentuali

aumentano drasticamente nelle infezioni nosocomiali in cui *K. pneumoniae* rappresenta il 77% degli isolati nelle feci, il 19% nella mucosa delle vie respiratorie e il 42% dei germi isolati dalle mani dei pazienti ricoverati (78).

Studi condotti negli ultimi anni hanno evidenziato una correlazione tra la manifestazione delle infezioni nosocomiali causate da *K. pneumoniae* e la somministrazione di terapie antibiotiche. Queste osservazioni suggeriscono che la crescente frequenza delle infezioni nosocomiali possa essere influenzata e selezionata dalle terapie antibiotiche attuate (79). Questa ipotesi è ulteriormente avvalorata dalla comparsa di numerosi ceppi di *K. pneumoniae* multi-resistenti negli ultimi decenni, ovvero ceppi che presentano resistenza a più di tre classi di antibiotici (80).

A partire dagli anni '90, sono stati isolati a livello mondiale alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* di tipo ESBL (extended spectrum β -lactamases), microrganismi produttori di enzimi β -lattamasi e cefalosporinasi ad ampio spettro, capaci di idrolizzare l'anello β -lattamico della maggior parte degli antibiotici β -lattamici.

Le *Enterobacteriaceae* ESBL rappresentano un problema non irrilevante per la sanità pubblica perché aggravano le condizioni cliniche del paziente già compromesse dalla patologia e limitano gli interventi terapeutici possibili. Questi ceppi risultano resistenti al trattamento con i β -lattamici, quali penicilline e cefalosporine ma non ai carbapenemi e, a tal proposito, gli antibiotici carbapenemi negli ultimi 20 anni hanno acquisito un'importanza clinica notevole, trovando applicazione con crescente interesse nelle terapie antibiotiche per le infezioni da *Enterobacteriaceae* ESBL positive e nella prevenzione della diffusione di questi ceppi (81).

La sensibilità a questa classe di farmaci ha permesso di superare la resistenza acquisita da tali batteri, ma studi epidemiologici condotti nello scorso decennio hanno individuato ceppi di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi, classificati come CRE (carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*), che hanno acquisito meccanismi aggiuntivi di antibiotico-resistenza (82-83).

Le specie CRKP (carbapenem resistant *K. pneumoniae*), come le CRE, sono produttrici di enzimi carbapenemasi che idrolizzano selettivamente l'anello β -lattamico degli antibiotici carbapenemi, rendendo quindi questa specie resistente a tutte le classi attualmente note di antibiotici β -lattamici.

In tutto il mondo sono sempre più aumentate le segnalazioni di outbreak di infezioni causate da *K.pneumoniae* (*Multi DrugResistant-MDR*) correlate a CPRE.

Notevole fu il caso verificatosi nel 2011-2012 di un outbreak di *Klebsiellapneumoniae* nel centro del Maryland che coinvolse 18 pazienti con 6 decessi.

L'epidemia fu studiata con il sequenziamento genomico di tutti i ceppi di *K.pneumoniae* isolati (84) in quanto non ci si può basare solo sulla caratterizzazione biochimica e di resistenza agli antibiotici per identificare il clade o i ceppi (strains) batterici. Lo studio fu poi esteso al sequenziamento dei plasmidi isolati da tutti i ceppi di enterobatteri resistenti ai carbapenemi identificati durante e dopo l'outbreak di *K.pneumoniae* (85).

Questi lavori dimostrarono la complessità dell'indagine di un possibile outbreak ospedaliero: l'epidemiologia tracciata per mezzo dell'analisi molecolare è molto più variata e complessa rispetto all'indagine epidemiologica. Di conseguenza, per delineare quanto è avvenuto durante un supposto outbreak occorre usare tutte le armi molecolari (sequenziamento genomico e plasmidico) come dimostrato dal recentissimo studio dell'università di Pittsburgh (86) in cui il sequenziamento genomico mostra la parentela genetica tra ceppi isolati dagli endoscopi utilizzati e ceppi isolati dai pazienti. Il contenuto genico e il sequenziamento plasmidico distinsero i ceppi dell'outbreak dai ceppi immessi sporadicamente e quelli endemici.

Nel nostro policlinico si è sospettato il rischio di un'epidemia di *K. pneumoniae* MDR nel 2012-2013 con il susseguirsi di possibili casi sporadici. Nel nostro laboratorio è stato effettuato uno studio epidemiologico su 25 ceppi di *Klebsiellapneumoniae* isolati da campioni di pazienti ricoverati presso il Policlinico Campus Bio-Medico di Roma tra il 2012 e il 2013. I ceppi sono stati caratterizzati primariamente per mezzo della Principal component Analysis (PCA) dei dendrogrammi prodotti dal MALDI-TOF. Quest'analisi ha individuato due clusters tra i 25 ceppi.

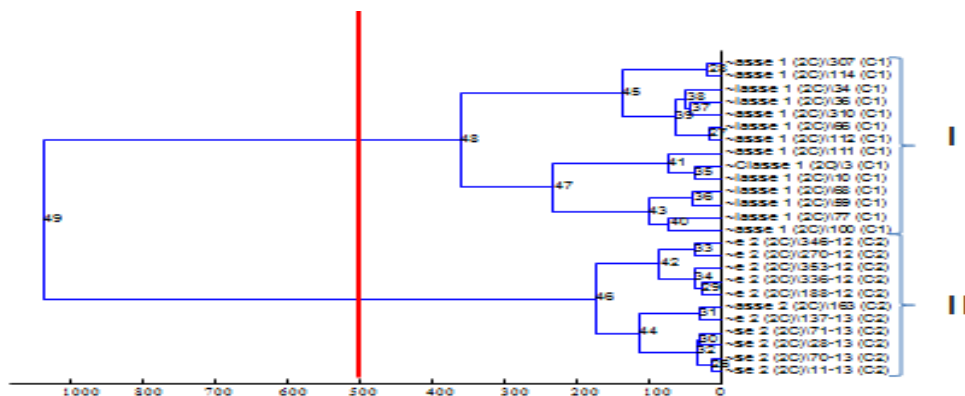


Fig.4:dendrogramma elaborato in base agli spettri proteici degli isolati ottenuti con il MALDI-Tof. La linea di cutoff è posta ad una distancelevel di 500 e permette la distribuzione dei ceppi in due gruppi.

L'analisi degli isolati che rientrano nel Cluster I fa emergere che tutti derivano da campioni clinici raccolti nell'arco dell'anno 2012, mentre gli isolati del Cluster II sono relativi a campioni clinici pervenuti tra ottobre 2012 e febbraio 2013.

Tra i ceppi del Cluster I si è osservata una netta prevalenza di sensibilità alla fosfomicina, eccetto che in 2 casi, mentre gli isolati del cluster II sono risultati tutti fosfomicina-resistenti. I dati ottenuti del dendrogramma sono stati integrati con quelli ottenuti dall'analisi genomica attraverso le tecniche di MLST (Multilocus Sequence Typing) e HRMA (High Resolution Melting Analysis) stabilendo che tutti i ceppi tranne 3 appartengono alla classe clonale ST512 (2 sono ST650 e 1 ST37). 1 isolato del cluster II è risultato essere ST37.(87)

I ceppi ST512 e ST650 fanno parte dello stesso complesso clonale ST258 che è anche quello di più frequente riscontro in Italia come dimostrato da Rossolini GM. *et al.* (2013) in un recente report epidemiologico (88). Inoltre, per ogni ceppo è stata sequenziata una regione dei geni *bla_{KPC}* che conferisce resistenza ai carbapenemi (in genere su transposone), e una del gene *cps* (capsule polysaccharide gene). I risultati mostrano che 21/25 isolati KPC presentano il gene *bla_{KPC}* di tipo 3; 4/25 isoalti KPC presentano il gene *bla_{KPC}* di tipo 2; 25/25 isoalti KPC presentano il gene *cps* tipo 2.(89)

Attraverso l'analisi si è identificato e confermato il sospetto epidemiologico di trasmissione del ceppo tra due pazienti e solo tra essi. I genomi dei 25 ceppi in studio

sono stati sequenziati e la loro filogenesi è in studio all'Istituto dei patogeni emergenti, Università della Florida Gainesvilli dalla dottoressa Fogolari.

CAPITOLO 3

SCOPO DEL LAVORO

Nel nostro policlinico, leader nella chirurgia pancreaticata , vengono eseguite numerose operazioni chirurgiche che interessano le vie biliari direttamente e soprattutto indirettamente (asportazioni di tumori epatici, delle vie biliari, del pancreas).

In tutte queste operazioni, ed in particolare in quelle pancreatiche, vi è un approccio previo che consiste nella esplorazione endoscopica delle vie biliari con o senza posizionamento di uno stent. Durante l'intervento viene prelevata la bile prima che le vie biliari vengano o meno interessate dalla operazione.

L'interesse primario del lavoro è quello di stabilire i fattori di rischio per infezioni biliari, epatiche o pancreatiche in relazione alla esplorazione delle vie biliari ed alla colonizzazione o infezione della bile.

Il nostro approccio è quello della "culturomics" che costituisce una parte notevole dello studio del microbiota intestinale, nel nostro caso biliare-duodenale.

Obiettivo primario del nostro studio è diventato l'analisi della colonizzazione della bile, delle vie biliari e del contenuto duodenale sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Va sottolineato che molto probabilmente la composizione del microbiota nei vari distretti dell'intestino tenue è diversa; nel nostro studio abbiamo analizzato solo la flora batterica residente o colonizzante dell'ampolla di Vater e della bile. L'ampolla di Vater o papilla duodenale maggiore è posizionata a livello della seconda porzione

duodenale, in essa confluiscono il dotto pancreatico maggiore o di Wirsung e il dotto coledoco che vi riversano il loro contenuto regolati dallo sfintere di Oddi.

Molti studi hanno suggerito un ruolo delle infezioni batteriche nella patogenesi della formazione dei calcoli biliari, ma fino ad oggi la letteratura non riporta dati certi che mettano in relazione i due eventi. In uno studio recentemente condotto dal gruppo di ricerca cinese di Sheng si è messo in evidenza come il microbiota biliare potrebbe essere influenzato da diversi fattori quali la dieta, lo stile di vita e il sistema immunitario (83).

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Campioni ed isolati batterici

I campioni di bile prelevata in sede intra-operatoria sono stati raccolti da pazienti ricoverati presso il reparto di Chirurgia generale del Policlinico Campus Bio-medico di Roma, tra gennaio 2014 e gennaio 2016.

4.2 Terreni di coltura selettivi e non-selettivi

I campioni sono stati seminati su terreni di coltura selettivi e non-selettivi (Columbia Blood Agar Base e agar sangue e agar cioccolato per tutti i tipi di batteri; agar MacConkey per i batteri Gram negativi; Columbia CNA Agar con 5% di sangue di pecora per i Gram positivi; Schaedler Agar per gli anaerobi stretti; Sabouraud Agar per i lieviti (Biomérieux e Liofilchem) con tecnica a “quattro quadranti”.

Le piastre sono state incubate a 37°C con 5% di O₂ per 24-48 ore.

Sono stati isolati ed identificati 168 ceppi batterici, raccolti, analizzati nel laboratorio di microbiologia

4.3 MALDI-TOF e analisi dei risultati

La spettrometria di massa MALDI-TOF (BrukerDaltonikGmbH,fig.5) è una tecnica analitica che consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica.



Fig. 5:strumento MALDI-Tof MSBruker 3.1 (BioMerieux)

La tecnica prevede che un campione batterico costituito da 10^4 - 10^6 cellule, proveniente da una brodocoltura o da una singola colonia, possa essere analizzato ottenendo in qualche minuto uno spettro di massa i cui segnali sono originati da componenti proteiche ribosomiali o loro frammentirilasciate in seguito a lisi della parete batterica. Porzioni di colonie fresche isolate, cresciute in piastra secondo protocolli di routine (18-24 ore), vengono deposte con il puntale di una micro pipetta al centro di uno spot di un "target plate" monouso in policarbonato con l'aggiunta di $1\mu\text{l}$ di matrice realizzata in materiali organici (acido α -ciano-4-idrossicinnamico) in grado di fungere da fonte di protoni necessari alla ionizzazione dell'analita in esame. In caso di identificazione di micetilievitiformi/filamentosi e micobatteri, la procedura differisce da quella standard per l'utilizzo, prima dell'inoculo della matrice, di acido formico o acido trifluoroacetico (TFA) al fine di aumentare l'efficienza di estrazione delle proteine fungine non facilmente disponibili per l'analisi.

Introdotta la "target plate" nell'apposito vano dello strumento, la matrice viene successivamente bombardata in più punti e ripetutamente con un fascio laser pulsato con frequenza nell'ultravioletto che ne determina la disgregazione e la ionizzazione grazie alla cessione di energia. Il risultato è la disgregazione del campione in numerosissimi frammenti con carica unitaria positiva (cationi monovalenti) costituiti ognuno da porzioni oligopeptidiche associate a porzioni di matrice organica. Una volta vaporizzati (desorbimento), i frammenti vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano in senso lineare attraverso il cosiddetto "tubo di volo" per raggiungere e colpire una membrana che rileverà e registrerà le masse ionizzate impattanti in tempi differenti in base alla massa stessa degli ioni.

Mediante il rilevatore di ioni, gli ioni impattanti su di esso vengono misurati nel loro rapporto massa/carica (m/z) potendo così risalire al peso molecolare della molecola analizzata.

L'analisi dei risultati avviene attraverso un software in grado di acquisire i dati in arrivo, elaborarli in spettri di massa e confrontarli con spettri di riferimento presenti nel database interno. Gli spettri sono acquisiti in modalità lineare positiva nell'intervallo di m/z 2000–20000. Ogni spettro di massa è acquisito sommando 100 spettri (30 è il numero minimo richiesto) in modo da assicurare una media più che significativa e affidabile degli spettri acquisiti in vari punti della colonia. La banca dati del software contiene spettri di riferimento che rappresentano più di 500 specie/sottospecie di batteri, micobatteri, lieviti e funghi significativamente rappresentativi della popolazione di interesse clinico.

Per la costruzione del database sono stati utilizzati ceppi di origine clinica (80-90%) e ceppi di riferimento ATCC (10-15%). Ognuno degli spettri di riferimento è stato costruito utilizzando da 10 a 20 differenti isolati clinici (cresciuti in differenti terreni di coltura, con range di temperatura e tempi di incubazione differenti) in modo da poter includere negli spettri stessi tutte le possibili varianti di massa derivanti sia da differenze genetiche intra-specie, sia da differenti condizioni di coltura. Il grado di corrispondenza con lo spettro tipico di ogni microrganismo presente nel database determina l'attribuzione di un cosiddetto Valore di Confidenza che esprime il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per la specie in esame. Una corrispondenza perfetta tra lo spettro e quello univoco di un singolo organismo, o

gruppo di organismi, fornisce una probabilità percentuale del 99,9. Nel caso di una singola specie proposta, se l'intervallo delle probabilità percentuali è compreso tra 60 e 99%, il livello di identificazione viene giudicato buono. Se la probabilità percentuale ottenuta per qualsiasi specie proposta è <60%, l'organismo non viene identificato e si procederà all'identificazione con altre metodiche disponibili in laboratorio.

I dati elaborati dal MALDI-ToF MS sono stati analizzati con il software **FlexControl** versione 3.4 fornito dalla Bruker e gli spettri proteici sono stati acquisiti utilizzando il sistema **Biotyper MSP**, come consigliato dalla casa produttrice. L'acquisizione e l'analisi dei picchi degli spettrometri di massa permettono la costruzione di un dendrogramma. Sul dendrogramma è stata tracciata in modo arbitrario una linea verticale che identifica i rami corrispondenti ai vari raggruppamenti. Questa linea deve essere posta in modo da minimizzare la distanza esistente tra i ceppi appartenenti allo stesso gruppo e di massimizzare quella esistente tra i diversi gruppi

4.4 VITEK 2 SYSTEM COMPACT

VITEK2 Systems Compact (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France) è un metodo commerciale automatico che determina spettrofotometricamente la crescita dei batteri e contemporaneamente dà l'identificazione e determina le MIC dei ceppi testati.

La metodologia prevede la preparazione della sospensione batterica ed il successivo trasferimento del giusto quantitativo (140µl) in una seconda provetta di soluzione salina sterile. Nella seconda provetta viene inserita la card Vitek AST per gli antibiogrammi. Le cards AST presentano 30 pozzetti contenenti dei substrati biochimici in forma disidratata che attraverso microdiluizioni determineranno le MIC (mg/L) per i diversi antibiotici. Le sospensioni vengono così inserite tramite appositi carrelli forniti dalla BioMérieux nello strumento e analizzate. Il sistema attraverso l'utilizzo di un software apposito valida e interpreta i risultati ai test di sensibilità determinando così i valori di MIC per i diversi agenti antibatterici.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Risultati

Sono stati analizzati 77 campioni di bile prelevata in sede intra-operatoria da pazienti ricoverati presso il reparto di Chirurgia generale del Policlinico Campus Bio-medico di Roma, tra gennaio 2014 e gennaio 2016.

Di questi 77 campioni, solo 16 si sono mostrati negativi alla coltura in piastra. I restanti 61 sono risultati positivi per crescita microbica in piastra su terreni selettivi e non- per Gram negativi, Grampositivi e per lieviti.

53 dei campioni positivi presentava flora batterica mista, mentre i restanti 8 mostravano un solo germe colonizzante e/o patogeno.

Sono stati da questi campioni quindi identificati 168 ceppi batterici, di cui 67 Gram negativi, 87 Gram positivi e 14 lieviti.

I Gram negativi isolati sono stati 67, tra questi le specie prevalenti sono *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, rispettivamente con 21 e 18 identificazioni. Tab.1

Batteri Gram negativi totali : 67	
<i>Escherichia coli</i>	21
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	18
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	4
<i>Enterobactercloacae</i>	4
<i>Proteusmirabilis</i>	3
<i>Citrobacterfreundii</i>	3
<i>Klebsiellaoxytoca</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	1
Altri	12

Tab.1: isolati di Gram negativi

I Gram positivi determinati sono stati 87, *Enterococcusfaecalis* ed *Enterococcusfaecium* con, rispettivamente, 25 e 16 isolati risultano essere i prevalenti. Tab.2.

Batteri Gram positivi totali : 87	
<i>Enterococcusfaecalis</i>	25
<i>Enetrococcusfaecium</i>	16
<i>Enterococcusraffinosis</i>	5
<i>Enterococcuscaseliflavus</i>	6
<i>Enterococcuspp.</i>	2
<i>Clostridiumperfringes</i>	4
<i>Enterococcusavium</i>	1
<i>Staphylococcushaemolyticus</i>	3
Altri	23

Tab.2: isolati di Gram positivi

Per i lieviti solo 14 isolati, 9 di *Candida albicans*, 2 di *Candida glabrata*, 1 di *Candida tropicalise* altri 2 di altre specie di lieviti. Tab.3.

Funghi lieviformi totali : 14	
<i>Candida albicans</i>	9
<i>Candida glabrata</i>	2
<i>Candida tropicalis</i>	1
Altri	2

Tab.3: isolati di lieviti.

La specie batterica maggiormente riscontrata è l'*Enterococcus faecalis* con 25 isolati batterici seguita dall'*Escherichia coli* (21 isolati).

L'identificazione dei diversi ceppi è stata effettuata tramite lo strumento MALDI-TOF Bruker Daltonik GmbH, mentre l'antibiogramma di ognuno è stato effettuato attraverso il metodo sistema automatizzato Vitek 2 System.

Di questi 168 ceppi, 16 risultano di particolare rilevanza clinico-epidemiologica in quanto germi sentinella, *Multi Drug Resistant*, (MDR); 28 risultano essere produttori di beta lattamasi ad ampio spettro (terapia con le penicilline, le cefalosporine, l'aztreonam e le combinazioni penicilline + inibitori di beta lattamasi potrebbe essere poco efficace o inefficace); 6 germi presentano meticillino resistenza.

Tra i ceppi MDR troviamo *K.pneumoniae* come genere prevalente con ben 6 isolati, seguita da *P.aeruginosa* (4 isolati) e da *Enterococcus faecium* con 2 identificazioni.

Tra i 28 ceppi ESBL+, *E.coli* è sicuramente il più diffuso con ben 15 identificazioni, seguita da *K.pneumoniae* con 10 isolati e da *E.cloacae* con 2.

I 6 ceppi meticillino resistenti sono rappresentati da *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*.

Sono stati poi determinati utilizzando il software del Bruker diversi dendogrammi per effettuare una "analisi dei gruppi" (cluster analysis) batterici, per individuare determinati sottoinsiemi (gruppi), le cui unità sono mediamente più simili fra loro di quanto non lo sia ciascuna di esse ad ogni unità degli altri gruppi.

Tutti i dendogrammi sono stati effettuati sui ceppi dei campioni analizzati tra gennaio 2014 e marzo 2015.

Il dendogramma numero 1 mostra come i batteri Gram positivi e Gram negativi vengano perfettamente posizionati in due cluster differenti e, all'interno di ogni gruppo si formano dei sottogruppi con batteri appartenenti alla stessa specie.

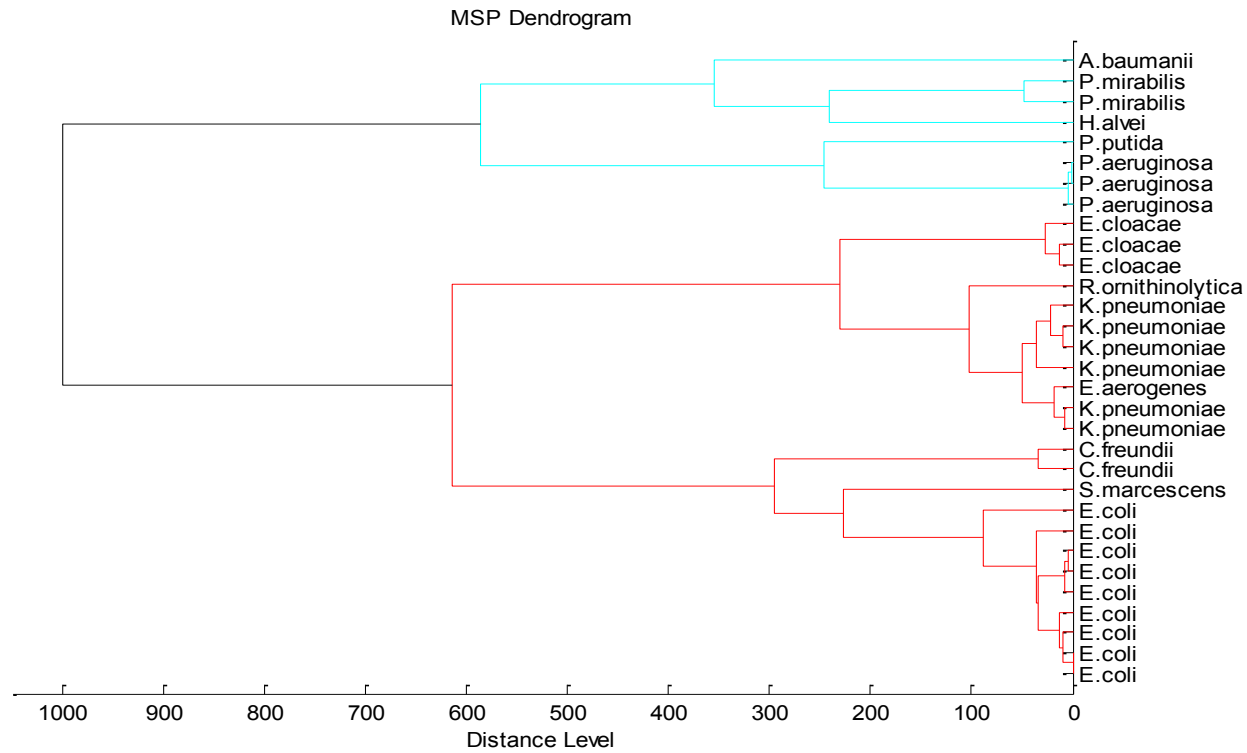
Il dendogramma numero 2 effettuato solo con tutti i Gram negativi mostra il formarsi di tre diversi clusters; quello blu a cui appartengono *P.aeruginosa*, *A.baumannii* e

P.mirabilis; quello centrale rosso a cui appartengono tutte le *Klebsielle* e quello rosso finale a cui appartengono tutti i coliformi.

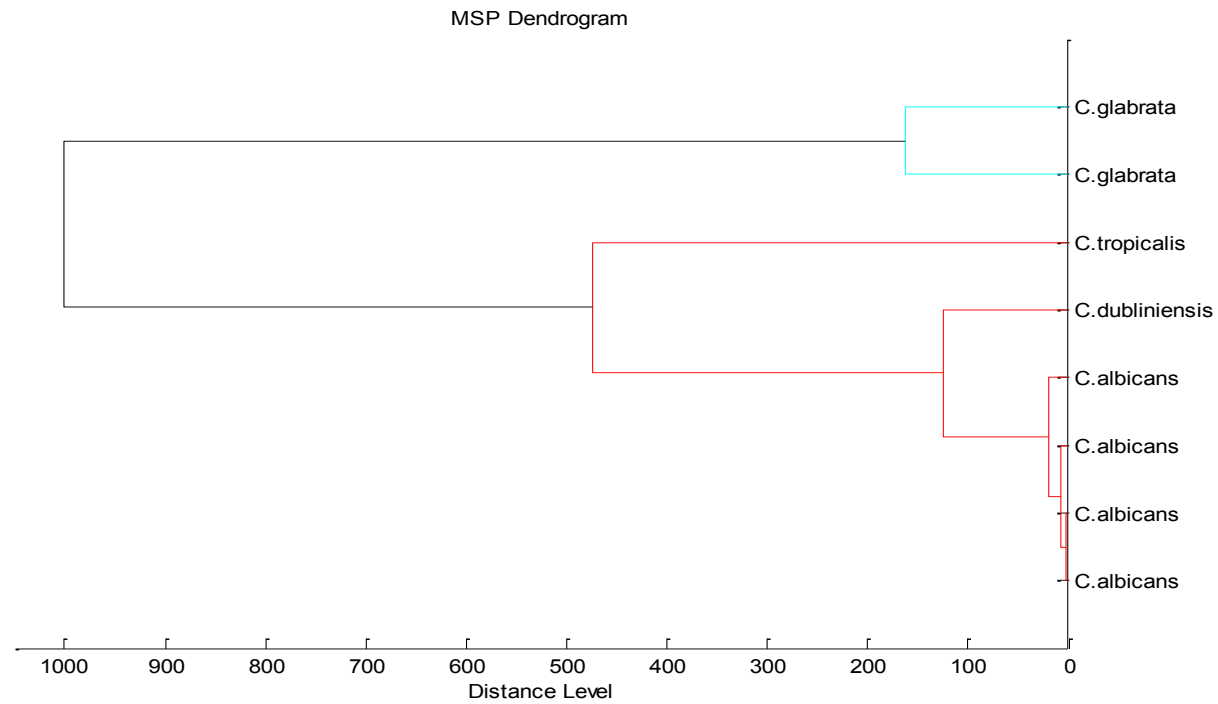
Per i batteri Gram positivi è stato fatto un dendogramma (n°3) che mette in evidenza come la spettrometria riesca perfettamente a separare in due clusters differenti gli *Enterococcus faecium* dal resto dei ceppi isolati. All'interno del secondo gruppo in rosso sono classificati in diversi sottogruppi gli altri enterococchi e gli streptococchi.

L'ultimo dendogramma (n°4) mostra la divisione perfetta delle *Candida albicans* dalle *Candida glabrata*.

Dendrogramma2: tutti i batteri Gram negativi tra gennaio 2014 e marzo 2015



Dendrogramma 4: distribuzione di funghi lievitriformi tra gennaio 2014 e marzo 2015



5.2 Discussione dei risultati e conclusioni

Il mondo del microbiota intestinale in persone sane o malate è ancora oggi un campo di studio molto vasto. L'obiettivo fondamentale della ricerca sul microbiota umano è quello di determinarne la struttura, la dinamica dei rapporti tra i batteri che lo compongono, le sostanze prodotte e consumate, l'interazione tra esso e l'ospite e le differenze nelle persone sane e malate.

Particolare attenzione è stata recentemente prestata alle infezioni da *Klebsiellapneumoniae* resistente ai carbapenemi (quindi Multi DrugResistant, MDR) susseguenti a colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE).

Nel nostro policlinico si è sospettato il rischio di un'epidemia di *K. pneumoniae* MDR nel 2012-2013 con il susseguirsi di possibili casi sporadici.

Nel nostro laboratorio è stato effettuato uno studio epidemiologico su 25 ceppi di *Klebsiellapneumoniae*, il cui risultato ha evidenziato il passaggio epidemiologico tra due pazienti.

Partendo dall'evidenza del rischio di outbreak di KPC in seguito a CPRE e sulla base delle nozioni acquisite sul microbiota intestinale, abbiamo deciso di voler studiare il microbiota residente o colonizzante la bile e l'Ampolla di Vater utilizzando le tecniche di "cultuomics", oggi giorno sempre più di supporto alle analisi metagenomiche.

La cultuomics ha evidenziato l'importanza di velocizzare i metodi identificativi dei batteri e si è così avvalsa dell'utilizzo della spettrometria di massa.

Lo studio è stato eseguito su analizzati 77 campioni di bile prelevata in sede intra-operatoria da pazienti ricoverati presso il reparto di Chirurgia generale del Policlinico Campus Bio-medico di Roma, tra gennaio 2014 e gennaio 2016, dando fino ad ora dei buoni risultati.

Sono stati isolati 168 ceppi batterici dai campioni risultati positivi alla coltura, tutti identificati dopo circa 24 ore dalla semina dei campioni con la metodica MALDI-TOF MS. In seguito sono stati eseguiti gli antibiogrammi di ciascun germe utilizzando il metodo semiautomatizzato Vitek System 2. Nel giro di 24-48h si è così potuto dare un referto microbiologico del campione in esame. Così facendo il clinico

ha a disposizione una serie di antibiotici da utilizzare nel caso in cui nei momenti successivi all'operazione il paziente sviluppi infezioni o sepsi.

I batteri maggiormente riscontrati sono stati *E.faecalis* ed *E.coli*, batteri ugualmente presenti nel microbiota intestinale.

K.pneumoniae risulta essere la specie MDR più rappresentata seguita da *P.aeruginosa* e da *E.coli*ESBL+.

A conferma della sensibilità e specificità dello strumento utilizzato è stata effettuata l'analisi dei dendogrammi. Il risultato è stato una perfetta separazioni in *clusters* differenti delle diverse specie batteriche identificate e alle resistenze antibiotiche.

Ciò sottolinea anche come non ci siano particolari correlazioni da un punto di vista filogenetico tra i vari batteri ritrovati nei diversi campioni di bile.

Ciò conferma che la spettrometria di massa è sicuramente, grazie alla sua precisione e rapidità, una tecnica valida per le analisi del microbiota della bile oltre che un aiuto nelle analisi epidemiologiche.

L'approccio culturomics va certamente potenziato con terreni e condizioni di coltura (atmosfera, pH, nutrienti ecc) che aumentino le possibilità di isolamento di germi esigenti, apparentemente non coltivabili. Dall'altro lato sappiamo che la culturomics permette di raggiungere l'isolamento del 50-60 % dei germi presenti nell'intestino.

Il prossimo step sarà quello di integrare questi dati con quelli ottenuti possibilmente dal pirosequenziamento per approfondire la composizione del microbiota della bile.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cryan J. F., Dinan T. G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701–712.
- 2) Sekirov I¹, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. *Gut microbiota in health and disease.* *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
- 3) Savage DC. *Microbial ecology of the gastrointestinal tract.* *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-133
- 4) Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care* (2001), 4: 571-579.
- 5) Raoult D. *Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora.* *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8), 631-634 .
- 6) Holines E, Li JY, Athanasion T, Ash rafian H, Nicholson JK. *Understanding the mole of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease.* *Trends Microbiol.* 2011;19(7), 349-359.
- 7) Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. *Gut microbiota in health and disease.* *Physiol. Rep.* 2010; 90(3), 859-904 .
- 8) Palmer C, Bik EM, Digiulio 1313, Relman DA, Brown PO. *Development of the human infant intestinal microbiota.* *PLoS Biol.* 2007; 5(7), e177 .
- 9) Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:19-25.
- 10) Armsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et *Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:61-7
- 11) Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwartz A, Klosterhalfen S, Frick JS. *The effects of maturation of the colonic microflora* *Gastroenterol. Res. Prat.* 2009; 75 :2401.
- 12) Agans R, Rigsbee I., Kenche H. Michail S, Khamis I II, Paliy O. *Distal microbiota of adolescent children is different from that of adults.* *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 77(2), 404-412.

- 13) Torroni F, Formi E, Pizze. *Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract*. Appl. Environ. Microbiol. 2009;75(6),1534-1539 .
- 14) Woodmansey EJ. *Intestinal bacteria and ageing*. J. Appl. Microbiol. 102(5), 1178-1186 (2007).
- 15) Cryan J. F., O'Mahony S. M., 2011. *The microbiome—gut—brain axis: from bowel to behavior*. Neurogastroenterol. Motil. 23, 187—192.
- 16) Lozupone C. A., Stombaugh J. I., Gordon J. I., Jansson J. K. & Rob Knight R., 2012. *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota* doi:10.1038/nature11550.
- 17) Bengmark S. *Pre-, pro- and synbiotics*. Curr Opin in Clin Nutr Metab Care (2001), 4: 571-579.
- 18) Savage DC. *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol. 1977;31:107-133.
- 19) Wang Y., Kasper L. H., 2014. *The role of microbiome in central nervous system disorders*. Brain Behav. Immun. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.015>
- 20) Belkaid Y., Naik S., 2013. *Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals*. Nat Immunol. 14(7):646-53. doi: 10.1038/ni.2604.
- 21) Ramakrishna BS¹. *Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism*. J Gastroenterol Hepatol. 2013 Dec;28 Suppl 4:9-17. doi: 10.1111/jgh.12294.
- 22) Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. *High prevalence of Methanobrevibacter smithii and Methanosphaerastadtmanae detected in the human gut using an improved DNA detection protocol*. PLoS One. 2009 Sep 17;4(9):e7063. doi: 10.1371/journal.pone.0007063.
- 4 .
- 23) Landman C, Quévrain Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications E Rev Med Interne. 2015 Dec 31.S0248-8663(15)01127-3
- 24) Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. *Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces*. J Bacteriol. 2003 Oct;185(20):6220-3.

- 25) Riley A *Bacteriophages in autoimmune disease and other inflammatory conditions*. *Hypotheses*.2004;62(4):493-8
- 26) Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Doré J, Leclerc M. *Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages?* *Gut*. 2008 Mar;57(3):424-5. doi: 10.1136/gut.2007.134668
- 27) Althani A, Marei HE, Hamdi WS, Nasrallah GK, El Zowalaty ME, Al Khdor S, Al-Asmakh M, Abdel-Aziz HJ *Human Microbiome and Its Association With Health and Diseases*. *Cell Physiol*. 2015 Dec 11. doi: 10.1002/jcp.25284.
- 28) Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau *Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics* *CBiologics*. 2011;5:71-86.
- 29) Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. *Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids*. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40: 235-243.
- 30) Chen W7, Anderson D. *Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plan fibers in cholesterol-fed rata*. *Proc Soc Exp Biol Med*.1984;175:215-218.
- 31) Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I, Bjorck IM. *Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rata*. *Br. Num* 1996;76:287-294.
- 32) Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. *Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonie epithelial cells in vitro*. *J Gastroenterol Hapatol* 1992; 7: 165-172.
- 33) Siavoshian S, Segain JP, Kornoprobst M, et al. *Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression*. *Gut* 2000; 46: 507-514.
- 34) Lefebvre P, Cariou 13, Lien KuipersStaels B. *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. *Physiol Rev*. 2009;89:147-191
- 35) Luhrs H, Gerke T, Muller JG, et al. *Butyrate inhibits N-E kappa B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis*. *Scand Gastroenterol*.2002;37:458-466.
- 36) Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. *Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43*. *Nature*. 2009;46 1: I 282-1286.

- 37) Pierro A, van Saene HK, Donnell SC, *et al.* Microbial Translocation in neonates and infants receiving long term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996; 131 : 176-179.
- 38) Bernet MF, Brassart D, Nesser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus LA I binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.* *Gut* 1994; 35: 483-489.
- 39) Hooper LV, Xu Falk PG, Midrvedt T, Gordon JI. *A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9833-9838
- 40) Brook J. *Bacterial interference.* *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 155-172.
- 41) Lievin V, Peiffer I, Hudault S, *et al.* *Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity.* *Gut* 2000. 47: 646
- 42) Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. *Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses.* *Dev Immunol* 1998; 6: 13-18
- 43) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, *et al.* *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.* *Science.* 2011;331 :337-341.
- 44) Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system.* *Cell.* 2005;122:107-18
- 45) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, *et al.* *Induction of intestinal Th 17 cells by segmented filamentous bacteria.* *Cell.* 2009;139:485-498.
- 46) Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease.* *Nature.* 2008;453: 620-625.
- 47) Dugas LR, Fuller M, Gilbert J, Layden BT. *The obese gut microbiome across the epidemiologic transition.* *Emerg Themes Epidemiol.* 2016 Jan 11;13:2. doi: 10.1186/s12982-015-0044-5. eCollection 2016.
- 48) Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M¹, Xu J, Qi C, Wang T. *The programming effects of nutrition-induced catch-up growth on gut microbiota and metabolic diseases in adult mice.* *Microbiologyopen.* 2016 Jan
- 49) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P,

- Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*. Nature. 2013 Aug 29;500(7464):541-6
- 50) Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L V., Koh, G.Y., Nagy, A. et al. (2004). *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 15718-15723
- 51) Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). *An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature 444, 1027-1031
- 52) Ley, R. E., Backhecl, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc. Nati Acad. Sci. USA 102, 11070-11075
- 53) Ley, E. (2010). *Obesity and the human microbiome*. Curr. Opin. Gastroenterol.201026:5-11.
- 54) Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccah, D., &Raoult, D. (2009). *Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals ara increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients*. PLoS ONE 4, e7125.
- 55) Ramirez-Farias, C., Slezak, E., Fuller, Z., Duncan, A, Holtrop, O., & Louis, P. (2009). *Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Etifidobacteri11171adolescentis and Faecatibacteriumprausnitzii*. Br. J. Nutr. 101, 541-550.
- 56) Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., et al. (2010). *Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grado inflammation markers*. Diabetes 59, 3049-3057.
- 57) Raoult, D. (2008). *Human microbiome: Take-home lesson on growth promoters?* Nature 454, 690-691.
- 58) Delzenne, N., &Reid,G. (2009). *No causal link between obesity and probiotics*.Net,Rev.Microbio. 7, 901.
- 59) Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg. J., Matti, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., et al. (2009). *Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents*. Obesity (Silver Spring) 17, 1906-1915.
- 60) Balamurugan, R., George, G., Kaheerdoss, J., Hepsiba,J., Chandragunasekaran,A.M.,and Ramakrishna, B. 5.(2010). *Quantitative*

- differences in intestinal Faecalibacteriumprausnitzii in obese Indian children.* Br.J. Nutr. 103, 335-338.
- 61) Lieto, R., Laitinen, S., Nermes, M., Isolami, E. (2010). *Impact of maternal probiotic supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study.* Br. J. Nutr. 103, 1792-1799.
- 62) Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. *Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics.* Biologics. 2011;5:71-86.
- 63) Sherwin E, Rea K, Dinan TG, Cryan JF. *A gut (microbiome) feeling about the brain.* Rev Med Interne. 2015 Dec 31. pii: S0248-8663(15)01127-3
- 64) Gordon J.I., 2012. *Honor thy gut symbionts redux.* Science 336, 1251-1253.
- 65) Woese C., Fox G., 1977. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.* Proceedings of the National Academy of Sciences 74(11): 5088–5090.
- 66) Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R.. *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985. 82, 6955–6959.
- 67) Qin J., Li R., Raes J., et al., 2010. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.* Nature 2010; 464:59-65.
- 68) De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet B. J., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P., 2010. *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 17;107(33):14691-6
- 69) Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. *Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study.* ClinMicrobiol Infect. 2012 Dec;18(12):1185-93.
- 70) Hugon P, Lagier JC, Robert C, Lepolard C, Papazian L, Musso D, Vialettes B, Raoult D. *Molecular studies neglect apparently gram-negative populations in the human gut microbiota.* J ClinMicrobiol. 2013 Oct;51(10):3286-93.

- 71) Delsenya M., Hanb B., Hsingc Y., 2010. *High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution*. Plant Science. 179: 407–422.
- 72) Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. *The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota*. ClinMicrobiol Rev. 2015 Jan;28(1):237-64.
- 73) Angeletti S, Dicuonzo G, D'Agostino A, Avola A, Crea F, Palazzo C, Dedej E, De Florio L *Turnaround time of positive blood cultures after the introduction of matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry*. New Microbiol. 2015 Jul;38(3):379-86. Epub 2015 Jul 6.
- 74) Artifon EL, Castano L.R., Otoch JP, Tchekmedvian AJ. *Endoscopic dilation of gastrointestinal tract* Rev Gastroenterol Peru 2015 Jan; 35(1): 45-61
- 75) Bergogne-Berezin E. (1995). *Nosocomial pathogens: new pathogens, incidence, prevention*. Presse Med. 24: 89-97.
- 76) Podschun R. and Ullmann U. (1998). *Klebsiella spp. as nosocomial pathogen: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors*. ClinMicrobiol Rev. 11: 589-603.
- 77) Highsmith AK. and Jarvis. WR. (1985). *Klebsiellapneumoniae: selected virulence factors that contribute to pathogenicity*. Infect. Control 6: 75-77.
- 78) Pittet D., Li N. and Wenzel RP. (1993). *Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality*. Eur. J. Clin. Microbiol.Infect. Dis. 12: 813-819.
- 79) 6. Selden R., Lee S., Wang WL. and Eickhoff TC. (1971). *Nosocomial Klebsiellainfections: intestinal colonization as a reservoir*. Ann.Intern. Med. 74: 657-664.
- 80) Pitout JD. and Laupland KB. (2008). *Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern*. Lancet Infect Disease; 8: 159-166.

- 81) Paterson DL., Mohapatra S., Casellas JM. and Yu V. (2004). International prospective study of *Klebsiellapneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann. Intern. Med.* 140: 26-32.
- 82) Nordmann P. and Poirel L. (2011). *Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Disease*; 17: 1791-1799
- 83) 10. Livmore DM. And Woodford N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. OpinMicrobiol*; 3: 489-495
- 84) Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F; NISC Comparative Sequencing Program Group, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA. *Tracking a hospital outbreak of carbapenem resistant Klebsiellapneumoniae with whole-genome sequencing*. *SciTransl Med.* 2012 Aug 22;4(148):148ra116.
- 85) Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, Snitkin ES, Clark TA, Luong K, Song Y, Tsai YC, Boitano M, Dayal J, Brooks SY, Schmidt B, Young AC, Thomas JW, Bouffard GG, Blakesley RW; NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin JC, Korlach J, Henderson DK, Frank KM, Palmore TN, Segre JA. *Single molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* *SciTransl Med.* 2014 September 17; 6(254): 254ra126.
- 86) Marsh JW, Krauland MG, Nelson JS, Schlackman JL, Brooks AM, Pasculle AW, Shutt KA, DoY, Querry AM, Muto CA, Harrison LH. *Genomic Epidemiology of an Endoscope-Associated Outbreak of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC)-Producing K. pneumoniae*. *PLoS One.* 2015 Dec 4;10(12):e0144310
- 87) Angeletti S, Dicuonzo G, Lo Presti A, Cella E, Crea F, Avola A, Vitali MA, Fagioni M, De Florio L. *MALDI-TOF mass spectrometry and blakpc gene phylogenetic analysis of an outbreak of carbapenem-resistant K. pneumoniae strains*. *New Microbiol.* 2015 Oct;38(4):541-50. Epub 2015 Oct 20.
- 88) Pantosti A, Pagani L, Luzzaro F, Rossolini GM (2013). Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiellapneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill.* 18; 1-13.
- 89) Shen H, Ye F, Xie L, Yang J, Li Z, Xu P, Meng F, Li L, Chen Y, Bo X, Ni M, Zhang X. *Metagenomic sequencing of bile from gallstone patients to*

Tesi di dottorato in Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione, di Genoveffa Francesca Sapia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 11/03/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

identify different microbial community patterns and novel biliary bacteria.
Sci Rep. 2015 Dec 2;5:17450.