



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E**  
**DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale**  
**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**  
**Curriculum Tecnologie Biologiche**

***PRESENZA DI GENI DI RESISTENZA AGLI***  
***OXAZOLIDINONI IN BATTERI FECALI DI ORIGINE BOVINA***

**DETECTION OF OXAZOLIDINONE RESISTANCE GENES**  
**IN FAECAL BACTERIA OF BOVINE ORIGIN**

***Tesi di Laurea Magistrale di:***

Fabio Fabbro

***Relatore:***

Prof.ssa Eleonora Giovanetti

***Correlatore:***

Dott.ssa Elisabetta Di Giannatale

Sessione Estiva (Luglio)

Anno Accademico 2019/2020



# SOMMARIO

1.INTRODUZIONE .....	1
1.1 Oxazolidinoni .....	6
1.1.1 Linezolid .....	8
1.1.2 Tedizolid .....	12
1.1.3 Meccanismo di Azione degli Oxazolidinoni .....	14
1.2 Meccanismi di Resistenza .....	17
1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S .....	18
1.2.2 Mutazioni nelle Proteine Ribosomiali L3 e L4 .....	20
1.2.3 Il Gene <i>cfr</i> .....	23
1.2.4 Il Gene <i>cfr(B)</i> .....	28
1.2.5 Il Gene <i>cfr(C)</i> .....	30
1.2.6 Il Gene <i>optrA</i> .....	33
1.2.7 Co-localizzazione dei Geni <i>cfr</i> e <i>optrA</i> .....	39
1.2.8 Il Gene <i>poxA</i> .....	42
2. MATERIALI E METODI .....	46
2.1 Campionamento ed Isolamento .....	46

2.2 Antibiotici e Test di Sensibilità .....	47
2.3 Estrazione DNA Totale .....	49
2.4 Saggi di Amplificazione .....	52
2.5 Saggi di Trasferibilità .....	54
2.6 S1-PFGE .....	56
2.7 Southern Blotting e Ibridazione .....	58
3.RISULTATI .....	61
3.1 Isolamento di Ceppi Florfenicolo-Resistenti e Screening per la Presenza di Geni di Resistenza agli Oxazolidinoni .....	61
3.2 Test di Sensibilità ed Identificazione .....	62
3.3 Trasferibilità dei Geni <i>optrA</i> e <i>poxTA</i> .....	65
3.4 Localizzazione Genica .....	67
4.DISCUSSIONE .....	69
5. BIBLIOGRAFIA.....	77
6. SITOGRAFIA .....	93

## **1.INTRODUZIONE**

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (AMR) rappresenta ad oggi una delle problematiche più complesse che la società odierna sia costretta ad affrontare. Sebbene la comunità scientifica sia ben consapevole dell'entità del fenomeno, la questione purtroppo è ancora ampiamente sottovalutata in altri ambiti. La percezione del problema è, infatti, ancora molto bassa lasciando presagire che ci sia ancora tempo per arginare il problema.

L'uso eccessivo, e spesso inappropriato, degli antibiotici sia in ambito umano che veterinario ha determinato il diffondersi di ceppi batterici antibiotico-resistenti, con gravi ripercussioni per la salute umana. In ambito clinico, l'AMR è diffusa a livello globale e interessa la maggior parte dei batteri patogeni il che rende molto problematico il trattamento di numerose infezioni. La situazione è esacerbata dalla carenza di nuovi antibiotici conseguente ad un rallentamento, negli ultimi decenni, nella ricerca e nello sviluppo di farmaci. L'insieme di tutti questi fattori ha concorso

all'emergere della "crisi della resistenza agli antibiotici", situazione che, non solo complica notevolmente il decorso clinico di molti pazienti, ma rischia anche di compromettere l'utilizzo di procedure mediche avanzate, come trapianti di organi e tessuti, terapie immunosoppressive, impianto di materiali protesici, che richiedono la disponibilità di antibiotici efficaci.

Secondo l'OMS, l'AMR rappresenta attualmente una delle maggiori minacce per la salute pubblica a causa dell'impatto epidemiologico ed economico del fenomeno (WHO, 2014). I dati epidemiologici relativi al nostro Paese e a livello internazionale mostrano che l'AMR è una delle minacce più serie per salute individuale e pubblica. L'OMS, nel rapporto stilato da Jim O'Neill, afferma che l'AMR è responsabile di circa 50.000 decessi ogni anno solo in Europa e Stati Uniti e stima che, in assenza di interventi efficaci, il numero di infezioni complicate da batteri antibiotico-resistenti potrebbe aumentare notevolmente nei prossimi anni, arrivando, nel 2050, a provocare il decesso di 10 milioni di persone all'anno. Oltre a ciò viene affrontato e valutato anche l'impatto economico del fenomeno a livello globale. Nel report di O'Neill si stima, infatti, una perdita economica cumulativa nei Paesi dell'OCSE

(Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) compresa tra i 20 e i 35 miliardi di dollari entro il 2050 (O'Neill, 2014). Negli ultimi anni sono state messe in atto misure importanti per la sorveglianza e il contenimento del problema AMR. Nel 2017, la Commissione Europea ha pubblicato il Piano "A European One Health Action Plan Against Antimicrobial Resistance", con il duplice obiettivo di ridurre il divario tra gli Stati Membri per quanto riguarda l'uso degli antibiotici e incoraggiare l'adozione e l'attuazione di piani nazionali di contrasto del fenomeno. Ciò ha portato in Italia alla nascita del Piano Nazionale di Contrasto dell'Antibiotico-Resistenza (Ministero della Salute, 2017) che ha lo scopo di fornire dati e indicazioni per la gestione e monitoraggio del problema in ambito medico, veterinario e alimentare. In Europa, secondo i più recenti dati resi disponibili dallo "European Centre for Disease Prevention" and Control (ECDC), l'AMR risulta complessivamente in aumento in molti Paesi, anche se con differenze nell'incidenza nei diversi patogeni e nei trend dei vari Stati Membri. In Italia, secondo quanto rilevato anche dalla sorveglianza sulle AMR curata dall'ISS (AR-ISS), la resistenza agli antibiotici si mantiene tra le più elevate in Europa, quasi sempre al

di sopra della media. Ciò è legato indubbiamente al fatto che in Europa l'Italia risulta essere il Paese, insieme alla Grecia, dove la somministrazione di farmaci è maggiore. Altro dato che merita attenzione è un maggior consumo al Sud e nelle Isole (20,4 DDD/1000 ab die) e al Centro (16,9 DDD/1000 ab die), rispetto al Nord (12,7 DDD/1000 ab die) secondo il rapporto AIFA del 2018. Nel rapporto emerge comunque una progressiva tendenza a un uso più attento di tali farmaci con una tendenza alla riduzione dei consumi proprio nelle aree di maggior utilizzo (Ministero della Salute, 2018).

L'impiego di antibiotici raggiunge, tuttavia, il suo apice in zootecnia. In alcuni Paesi, infatti, circa l'80% del consumo totale di antibiotici fondamentali in medicina umana è destinato al settore animale, spesso impropriamente con conseguenze importanti nello sviluppo delle resistenze. Già da molti anni sono stati presi provvedimenti in proposito come il divieto imposto dalla UE ai Paesi membri di somministrare antibiotici per promuovere la crescita animale. La stessa OMS pubblica periodicamente report sulle classi di antibiotici più importanti dal punto di vista sanitario sconsigliandone l'impiego in ambito veterinario. Nella quinta



revisione dell'elenco pubblicato nell'aprile del 2017, ad esempio, vengono segnalati come antibiotici essenziali, in quanto in grado di trattare infezioni sostenute da batteri multi-resistenti: chinoloni, cefalosporine di terza e più alta generazione, macrolidi e chetolidi, glicopeptidi e colistina (WHO, 2017). Il risultato prodotto da queste ed altre azioni non meno importanti sta portando ad una graduale riduzione nell'utilizzo di antibiotici nei paesi UE, tuttavia va sottolineato che in Italia questo decremento risulta essere ancora modesto. Anche se i risultati delle azioni correttive messe in atto dalle Istituzioni iniziano ad essere tangibili e offrono segnali incoraggianti, gli obiettivi sono ancora molto lontani dall'essere raggiunti, pertanto l'attenzione riguardo a questo problema deve rimanere ancora molto alta. In aggiunta, la ricerca farmaceutica sugli antibiotici ha subito un brusco calo nelle ultime decadi e va da sé che una riduzione del fenomeno attraverso un uso corretto e misurato degli antibiotici assume un significato ancor più importante.

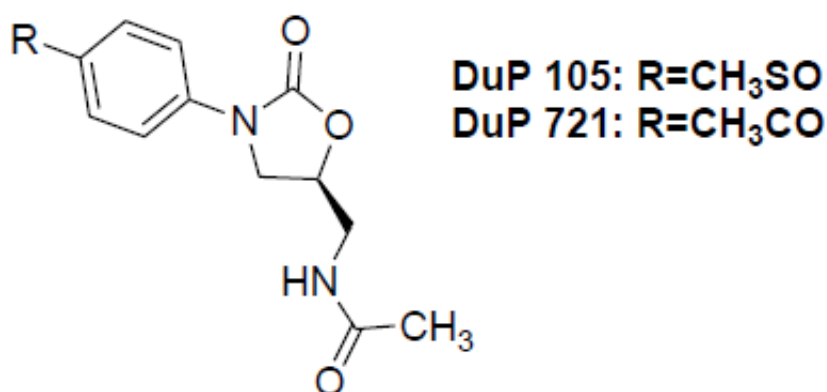
Negli ultimi anni tra le AMR emergenti ha assunto grande rilevanza la resistenza agli oxazolidinoni. Questa nuova classe antibiotica, approvata e commercializzata all'inizio del nuovo

millennio, è attiva nei confronti di batteri Gram-positivi inclusi *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), pneumococchi e micobatteri multiresistenti (MDR).

## 1.1 Oxazolidinoni

Negli anni '80 la crescente diffusione delle AMR, in particolare nei Gram-positivi, ha stimolato la ricerca di nuove molecole ad attività antimicrobica. Nel 1987, i ricercatori della E.I. DuPont de Nemours & Company (DuPont) presentarono una pubblicazione sull'attività antimicrobica di una nuova classe di farmaci: gli oxazolidinoni (Slee *et al.*, 1987). Il punto di partenza di questo studio furono una serie di molecole racemiche (5-alometil-3-fenil-2-ossazolidinoni) efficaci nel trattamento di diverse patologie delle piante. Attraverso modificazioni chimiche si ottennero analoghi che mostravano, sia in vitro che in vivo, una modesta attività antibatterica nei confronti di diverse specie Gram-positive e Gram-negative (Shinabarger *et al.*, 2009). Non secondario in termini di compliance era il fatto che questa classe di molecole potesse essere somministrata per via orale. La ricerca si concentrò su due derivati, Dup721 e Dup105

(Fig.1), il cui sviluppo fu inizialmente abbandonato a causa della loro elevata tossicità. Solo successivamente l'aggiunta di nuove modifiche strutturali consentì di preservare l'attività antibatterica riducendo però gli effetti tossici.



**Figura 1.** DuP 721 e DuP 105, molecole che hanno portato allo sviluppo del linezolid

A partire da tali molecole, alla fine degli anni '90, Pharmacia sintetizzò i primi oxazolidinoni; la ricerca si concentrò in modo particolare su due derivati: eperezolid (PNU-100592) e linezolid (PNU-100766). Tra i due candidati si decise di continuare la sperimentazione con il linezolid che mostrava efficacia superiore (in termini di MIC e MIC50), spettro più ampio, oltre a una farmacocinetica più favorevole. Il linezolid è uno dei pochi farmaci

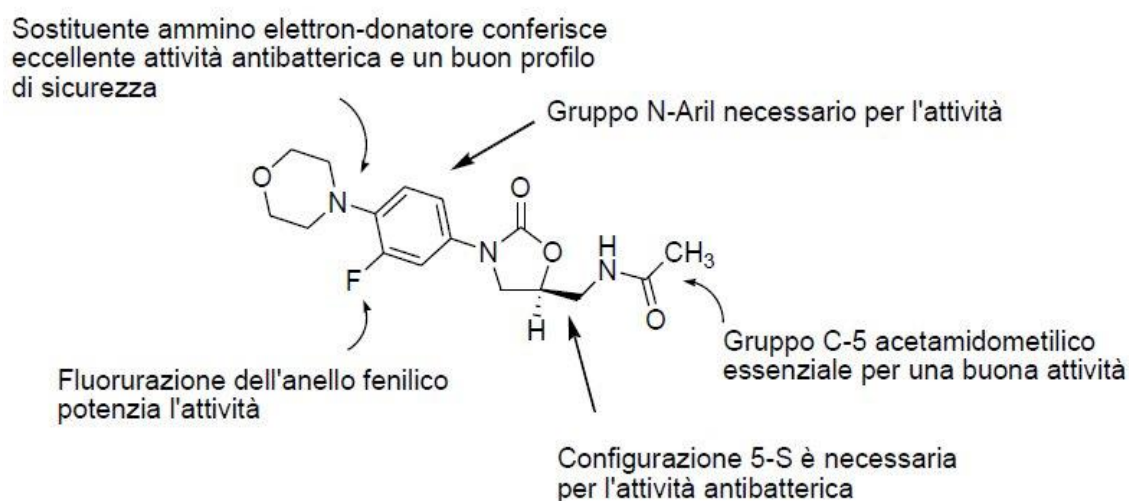
sintetizzati de novo ad essere stato scoperto negli ultimi 40 anni (Park *et al.*, 1992).

### **1.1.1 Linezolid**

Il linezolid è stato approvato dalla Food and Drug Administration americana nell'aprile del 2000 e commercializzato con il nome di ZYVOX®. Il suo spettro include importanti patogeni Gram-positivi quali stafilococchi, enterococchi e streptococchi inclusi ceppi resistenti: VRE, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* penicillino-resistente (Birmingham *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la sua attività in vitro, vengono riportati i seguenti valori di MIC90:  $\leq 4\mu\text{g/ml}$  per *S. aureus* (MRSA e MSSA),  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  per *Staphylococcus epidermidis* (MSSE ed MRSE),  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis* (inclusi i VRE),  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  per *S. pneumoniae* MDR,  $\leq 4\mu\text{g/ml}$ , per *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp. e *Mycobacterium avium* complex, e  $\leq 4\mu\text{g/ml}$  per *Listeria monocytogenes* (Gemmell *et al.*, 2001).

Il linezolid, la cui formula è  $C_{16}H_{20}FN_3O_4$ , ha massa molare di 337,3461 g/mol (Fig. 2). La struttura degli oxazolidinoni mostra quattro gruppi: un gruppo A (eterociclo centrale ossazolidinico), un gruppo B (N-arile legato all'azoto dell'anello A), un gruppo C (legato al gruppo B con funzione stabilizzante) e una catena laterale (gruppo funzionale legato al C5 del gruppo A). Il gruppo N-arile e la configurazione S del C5 nel gruppo ossazolidinico sono fondamentali per l'attività del farmaco, così come il gruppo acil-ammino-metilico legato al C5 del gruppo ossazolidinico. Il fluoro dell'anello arilico ne potenzia l'attività. Il gruppo morfolinico, legato all'anello aromatico, ha la funzione di aumentare la solubilità e quindi di migliorare la farmacocinetica del farmaco (Poce et al., 2014).



**Figura 2.** *Struttura del linezolid*

Il linezolid viene impiegato nel trattamento di gravi infezioni della pelle, dei tessuti molli e nelle polmoniti nosocomiali; risulta altresì efficace nell'eradicare infezioni da *Mycobacterium tuberculosis* (Drusano *et al.*, 2018) e *Mycobacterium avium* (Deshpande *et al.*, 2017).

Il suo impiego clinico è limitato alle infezioni non trattabili con altri farmaci e in caso di insuccesso terapeutico (Zoller *et al.*, 2014).

Somministrato per via orale (oltre che per via parenterale) mostra elevata biodisponibilità, un'emivita di 4-6 ore, e una buona diffusione tissutale. La contemporanea assunzione di cibo non ne modifica in modo significativo l'assorbimento; la concentrazione plasmatica massima ( $C_{max}$ ) è raggiunta entro 2 ore dall'assunzione. Il linezolid viene principalmente metabolizzato mediante ossidazione dell'anello morfolinico, con formazione prevalentemente di due derivati inattivi dell'acido carbossilico ad anello aperto: il metabolita acido aminoetossiacetico (PNU-142300) e il metabolita idrossietil-glicina (PNU-142586). Il farmaco, in condizioni steady state, viene principalmente escreto

con le urine come PNU-142586 (40%), farmaco inalterato (30%) e PNU-142300 (10%) nei pazienti con funzionalità renale normale o insufficienza renale lieve-moderata. L'escrezione in forma inalterata può essere sufficiente per il trattamento di infezioni del tratto urinario. La somministrazione di linezolid è sconsigliata in presenza di alcuni stati patologici come feocromocitoma, sindrome carcinoide, tireotossicosi, depressione bipolare, schizofrenia e stati confusionali acuti.

Tra gli effetti collaterali più comuni sono segnalati nausea, cefalea, diarrea, vomito ed insonnia. Seppur ritenuto un farmaco sicuro, la sua somministrazione per lunghi periodi può causare effetti collaterali anche di una certa entità come ad esempio trombocitopenia, neuropatia ottica, neuropatia periferica e acidosi lattica (Kishor *et al.*, 2015). Recentemente, il linezolid è risultato associato a crisi parziali complesse e stato epilettico in pazienti con epilessia conclamata (Rival *et al.*, 2020). E' opportuno effettuare controlli durante la terapia: esami epatici e renali, ed emocromo completo ad intervalli regolari. Il linezolid è, inoltre, un inibitore non-selettivo reversibile delle monoaminossidasi (MAO) e perciò può interagire con farmaci adrenergici e serotoninergici; pertanto,

durante il trattamento e nelle 2 settimane successive all'interruzione dell'antibiotico, va evitata l'assunzione di altri MAO-inibitori.

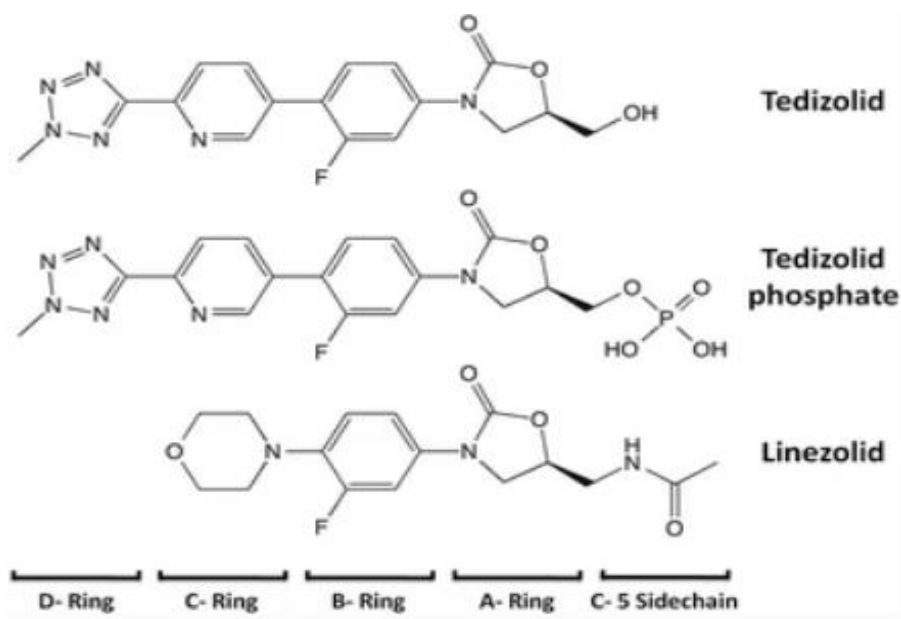
### **1.1.2 Tedizolid**

Negli anni ultimi sono state condotte numerose ricerche al fine di analizzare, per un eventuale uso clinico, derivati del linezolid con caratteristiche migliori in termini di stabilità, emivita ed efficacia. Nel 2014 la FDA ha approvato un nuovo oxazolidinone di seconda generazione, il tedizolid, per il trattamento di infezioni severe della pelle e dei tessuti molli. Lo spettro di azione di questo oxazolidinone, commercializzato con il nome di SIVEXTRO®, rimane sostanzialmente invariato rispetto al linezolid, ma la sua efficacia risulta notevolmente superiore risultando da quattro a sedici volte più attivo nei confronti di stafilococchi ed enterococchi (Kanafani *et al.*, 2012). Inoltre, avendo una emivita maggiore, il dosaggio giornaliero è di 200 mg/die, a fronte dei 600 mg/die necessari per il linezolid. Il trattamento, la cui durata complessiva è di circa sei giorni, può essere somministrato sia per via orale che parenterale. Anche in questo caso la biodisponibilità a seguito della



somministrazione orale presenta valori ottimali superando il 90% (Flanagan *et al.*, 2014). Tra gli effetti collaterali più comuni vi sono nausea, cefalea, diarrea, e vomito. Rispetto al linezolid, l'impiego di tedizolid è associato a un minor rischio di insorgenza nel paziente sottoposto a trattamento di neuropatie ottiche e periferiche (FDA, 2019).

Per quanto riguarda la struttura del tedizolid (Fig. 3), il farmaco risulta simile al linezolid seppur con modifiche importanti che consistono nella presenza di un gruppo idrossimetile laterale, un anello piridinico nel gruppo C e un gruppo D addizionale costituito da metil-tetrazolo, i gruppi A e B risultano, invece, inalterati. Al gruppo OH della catena laterale è legato un gruppo fosfato, che viene rimosso in circolo dalla fosfatasi alcalina, per aumentarne la solubilità. Inoltre, questo gruppo maschera il C5 dell'anello A responsabile del legame con le MAO. Il gruppo addizionale D del tedizolid è ritenuto responsabile della sua maggiore affinità con il sito di legame e della sua efficacia nei confronti di ceppi linezolid-resistenti *cfr*-positivi (Kisgen *et al.*, 2014).

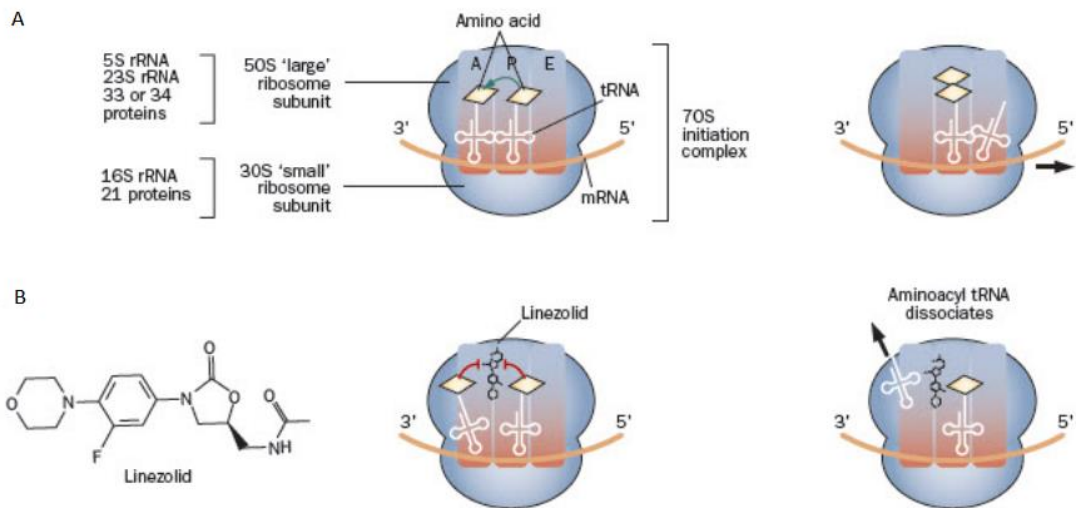


**Figura 3.** Confronto tra le molecole del linezolid e del tedizolid

### 1.1.3 Meccanismo di Azione degli Oxazolidinoni

Gli antibiotici appartenenti alla classe degli oxazolidinoni possiedono un meccanismo di azione basato sull'inibizione della sintesi proteica. Il legame dose-dipendente di queste molecole in corrispondenza del centro della peptidiltransferasi (PTC) della subunità ribosomiale 50S, inibisce l'inizio della traduzione (Fig. 4). Il PTC è situato nella parte interna della subunità 50S, nella porzione inferiore della tasca in cui si posizionano l'estremità 3' dell'aminoacil-tRNA e il peptidil-tRNA nel processo di sintesi proteica. L'interazione del linezolid con l'rRNA 23S nel sito A del

PTC impedisce quindi la formazione del complesso tRNA<sup>fMet</sup>-mRNA-70S con conseguente blocco della traduzione. L'inibizione, in una fase così precoce della traduzione, previene anche la sintesi di vari fattori di virulenza come ad esempio la coagulasi di *S. aureus* e le emolisine streptococciche e stafilococciche. Altro dato interessante, emerso dall'analisi cristallografica dell'interazione farmaco-ribosoma, è che il legame del linezolid al sito A provoca dei cambiamenti nella posizione di alcuni nucleotidi nel sito P e nello specifico, la posizione del nucleotide U2585, essenziale per il corretto posizionamento del tRNA nel sito P. Il linezolid condivide in parte il sito bersaglio con altre classi di antibiotici attivi sulla sintesi proteica, quali i fenicoli, la tiamulina, la clindamicina e le streptogramine di gruppo A; ciò spiega la cross-resistenza tra linezolid e queste molecole.



**Figura 4.** A) Processo di sintesi proteica. B) La presenza di linezolid impedisce il posizionamento del tRNA nel sito A del PTC con conseguente blocco della traduzione

Le differenze nel meccanismo d'azione del linezolid e degli altri inibitori della sintesi proteica risiedono nel fatto che i loro target non sono identici e il legame interferisce in modo diverso sulla disposizione spaziale dei nucleotidi circostanti (Long *et al.*, 2012).

Potenzialmente il farmaco inibisce la sintesi proteica sia nei Gram-positivi che nei Gram-negativi, tuttavia, in questi ultimi, la presenza di pompe di efflusso conferisce una resistenza endogena. A tal proposito, l'inattivazione tramite mutagenesi diretta della pompa transmembrana AcrAB di *Escherichia coli* ripristina la sensibilità del microrganismo al linezolid (Swaney *et al.*, 1998).

## 1.2 Meccanismi di Resistenza

I meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni sono riconducibili: (i) alla comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22, e (ii) all'acquisizione di determinanti di resistenza trasferibili (*cfr*, *optrA* e *poxxA*).

I geni che codificano la resistenza agli oxazolidinoni, in virtù della loro frequente localizzazione su elementi genetici mobili, possono diffondere per “horizontal gene transfer” (HGT). Ciò è motivo di grave preoccupazione per le possibili conseguenze per la salute umana.

La natura sintetica del linezolid aveva indotto a pensare che fenomeni di resistenza sarebbero emersi con difficoltà, tuttavia, i primi ceppi resistenti sono stati segnalati poco dopo la sua approvazione da parte della FDA e del suo impiego nella pratica clinica.

Le prime resistenze, dovute a mutazioni spontanee, sono state riscontrate negli enterococchi (Gonzales *et al.*, 2001) e successivamente negli stafilococchi (Tsiodras *et al.*, 2001) e negli streptococchi (Wolter *et al.*, 2005). Questo tipo di resistenza è

emersa inizialmente in reparti ospedalieri critici, spesso dopo un uso prolungato del farmaco, poi è stata segnalata anche in ceppi di origine animale.

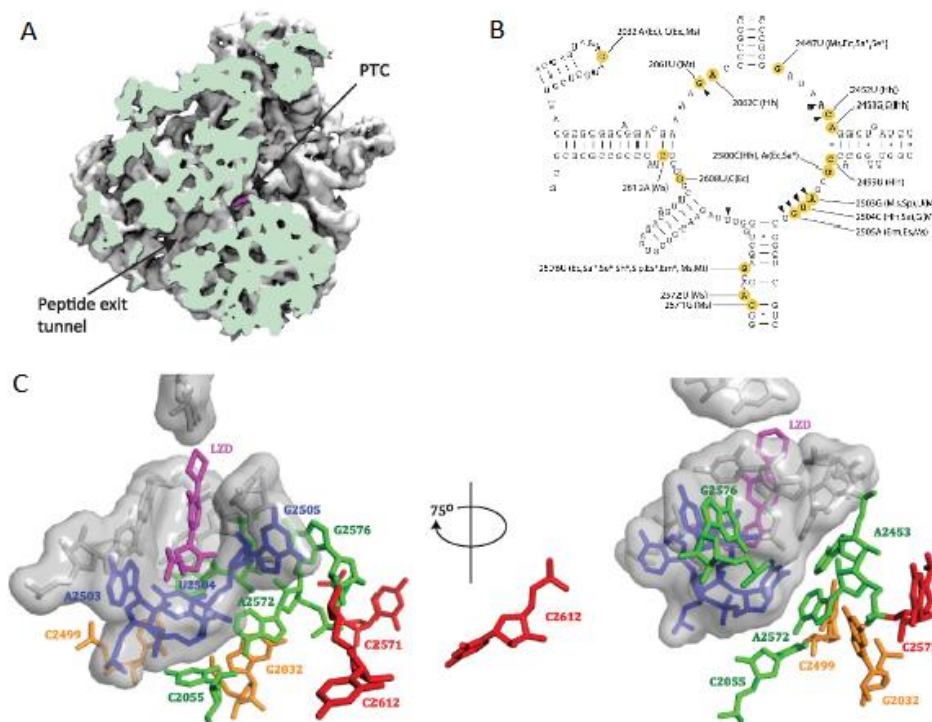
Nell'ultimo decennio, alla resistenza da mutazione si è affiancata quella codificata dal gene *cfr*, poi dal gene *optrA* e recentemente dal gene *poxtA*.

### **1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S**

Il sito di legame del linezolid è a livello del PTC che risiede nel dominio V dell'rRNA23S. Mutazioni nucleotidiche a questo livello possono dare luogo ad alterazioni strutturali in grado di compromettere la capacità di legame del farmaco (Fig. 5). I nucleotidi che interagiscono direttamente con il linezolid sono G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585 (Wilson *et al.*, 2008). Anche altri nucleotidi, non direttamente coinvolti nel legame con la molecola, possono conferire resistenza in caso di mutazione: A2062, G2447, A2453, C2499, U2500 e G2576. Particolare rilevanza hanno le mutazioni G2576U e G2447U in grado di dar luogo a resistenze importanti (Miller *et al.*, 2008). Va sottolineato che la mutazione G2576, infatti, rappresenta una

delle mutazioni più frequentemente rilevate negli isolati clinici e ciò è dovuto prevalentemente a trattamenti prolungati o ad alte dosi di linezolid (Hill *et al.*, 2010).

Altro elemento rilevante è che mutazioni ad una data distanza dal sito di interazione del farmaco possono avere effetti diversi nelle varie specie batteriche; inoltre, dal momento che l'operone per rRNA 23S è presente in genere in più copie, è stata dimostrata una certa correlazione tra il numero di operoni mutati e il grado di resistenza al linezolid in termini di MIC (Souli *et al.*, 2009).



**Figura 5.** A) Legame della molecola del linezolid (magenta) a livello del PTC della subunità 50S (sezionata).

B) Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA23S. I nucleotidi che vanno incontro a mutazione sono evidenziati in giallo mentre sono evidenziate in grassetto le mutazioni che conferiscono un incremento significativo della MIC di linezolid (>4 volte). Sono marcati con triangolini neri i nucleotidi che interagiscono direttamente con il linezolid. Le mutazioni e gli organismi corrispondenti sono indicati con due lettere: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*Staphylococcus epidermidis*), Sh (*Staphylococcus haemolyticus*), Sp (*S. pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*Mycobacterium smegmatis*), Mt (*M. tuberculosis*), Hh (*Halobacterium halobium*). Gli asterischi indicano mutazioni descritte in ceppi di isolamento clinico.

C) Visione tridimensionale della posizione del linezolid in relazione a nucleotidi soggetti a mutazione

## 1.2.2 Mutazioni nelle Proteine Ribosomiali L3 e L4

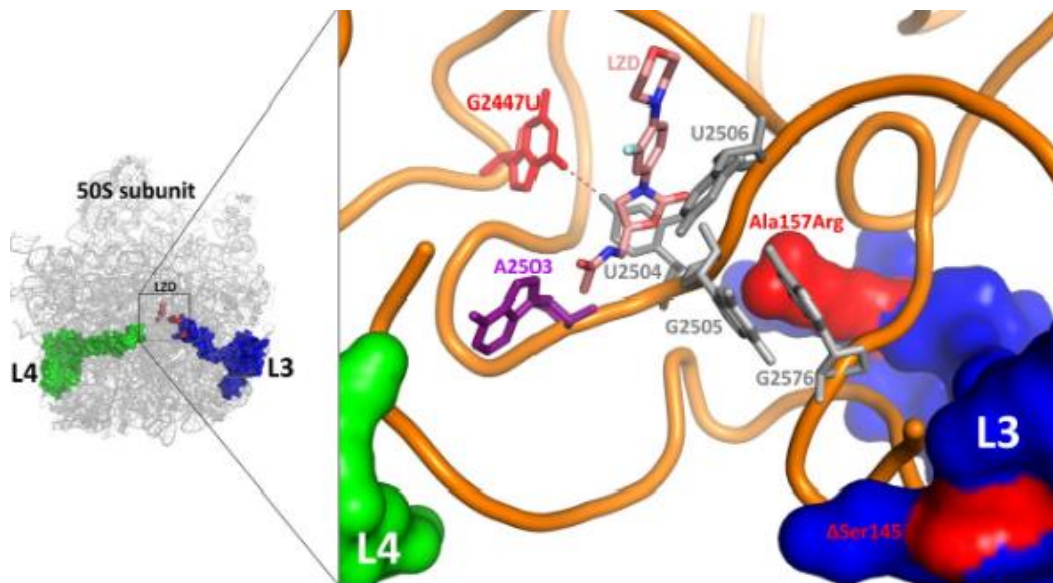
Altro meccanismo di resistenza da mutazione è quello a carico delle proteine ribosomiali L3 ed L4. Tra le due, è prevalentemente coinvolta la proteina L3 probabilmente perché, pur risultando



posizionata sulla superficie della subunità 50S, grazie a due estensioni di uno dei suoi loop che raggiungono il PTC, risulta più vicina al sito di legame del linezolid (Fig. 6). La prima resistenza antibiotica dovuta ad alterazione di questa proteina è quella alla tiamulina/valnemulina, descritta nel 2003 (Bøsling *et al.*, 2003). Solo successivamente altri studi, condotti su *S. aureus*, *S. epidermidis* ed enterococchi, hanno correlato questo tipo di alterazione alla resistenza al linezolid. Le mutazioni in L3 sono state spesso riscontrate insieme a mutazioni dell'rRNA 23S così come in ceppi che possedevano il gene *cfr*. Alcune alterazioni della proteina L3, come ad esempio F147L e A157R, sono risultate in grado di conferire resistenze al linezolid ad alto livello in termini di MIC (Mendes *et al.*, 2010). Una situazione particolare è rappresentata dalla possibile presenza di alterazioni nella proteina L3 con effetto compensatorio, a livello strutturale, sulle mutazioni dei nucleotidi dell'rRNA 23S (Billal *et al.*, 2011).

La proteina L4, invece, si trova in prossimità del PTC in vicinanza del canale attraverso il quale il peptide nascente lascia il ribosoma. Una delezione di sei nucleotidi nel gene codificante per questa proteina ( $\Delta$ K68-G69) è stata associata in un caso di

resistenza al linezolid in un ceppo di *S. pneumoniae* (Wolter *et al.*, 2005). In un altro studio su un isolato di *C. perfringens* linezolid-resistente è stata riscontrata la mutazione C404T del gene *rplD* codificante la proteina L4 con conseguente sostituzione della glicina in posizione 71 con l'aspartato (Hölzel *et al.*, 2010). Dato che le mutazioni a carico della proteina L4 sono spesso associate a mutazioni nell'rRNA 23S il loro reale contributo alla resistenza al linezolid è ancora difficile da definire (Long *et al.*, 2012).



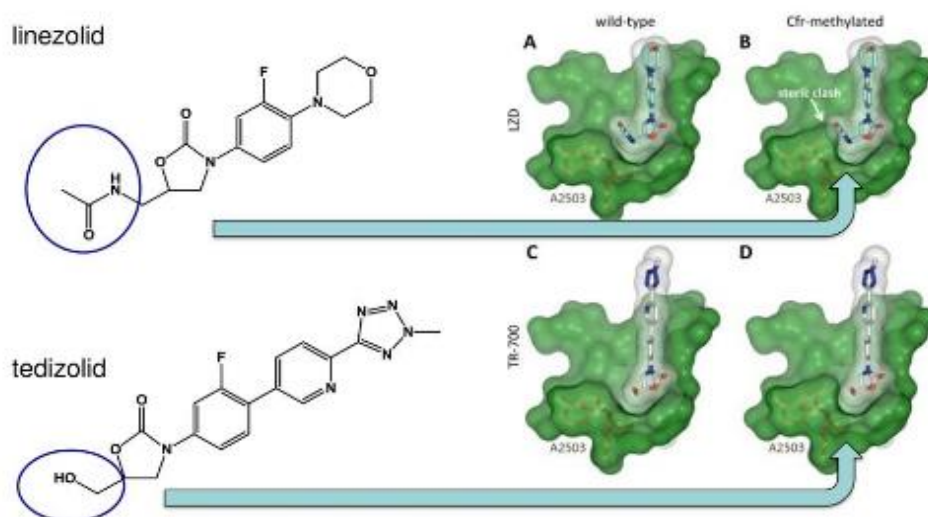
**Figura 6.** Posizione del sito di legame del linezolid in relazione alle proteine ribosomiali L3 (blu) ed L4 (verde). In rosso sono indicate le mutazioni Ala157Arg e ΔSer145, due tra le mutazioni più frequentemente riscontrate

Accanto alle mutazioni delle proteine L3 ed L4 vengono riportate anche mutazioni alla proteina ribosomiale L22. Il fenomeno di resistenza dovuto a mutazioni a carico di quest'ultima si ritiene essere dovuto alla sua locazione in prossimità del sito di legame del linezolid. Risulta essere un tipo di resistenza piuttosto rara e riscontrata principalmente in *Staphylococcus* spp. (Lee *et al.*, 2017).

### **1.2.3 Il Gene *cfr***

Il primo meccanismo di resistenza trasferibile al linezolid ad essere identificato è stato quello codificato dal gene *cfr*. Questo gene, descritto per la prima volta in un ceppo di *Staphylococcus sciuri* all'interno del plasmide pSCFS1 (Schwarz *et al.*, 2000), è in grado di conferire resistenza a cinque differenti classi di antibiotici che hanno come bersaglio siti contigui, ma non identici, nel PTC: fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A. Il fenotipo che ne risulta è denominato PhLOPSA (Long *et al.*, 2006).

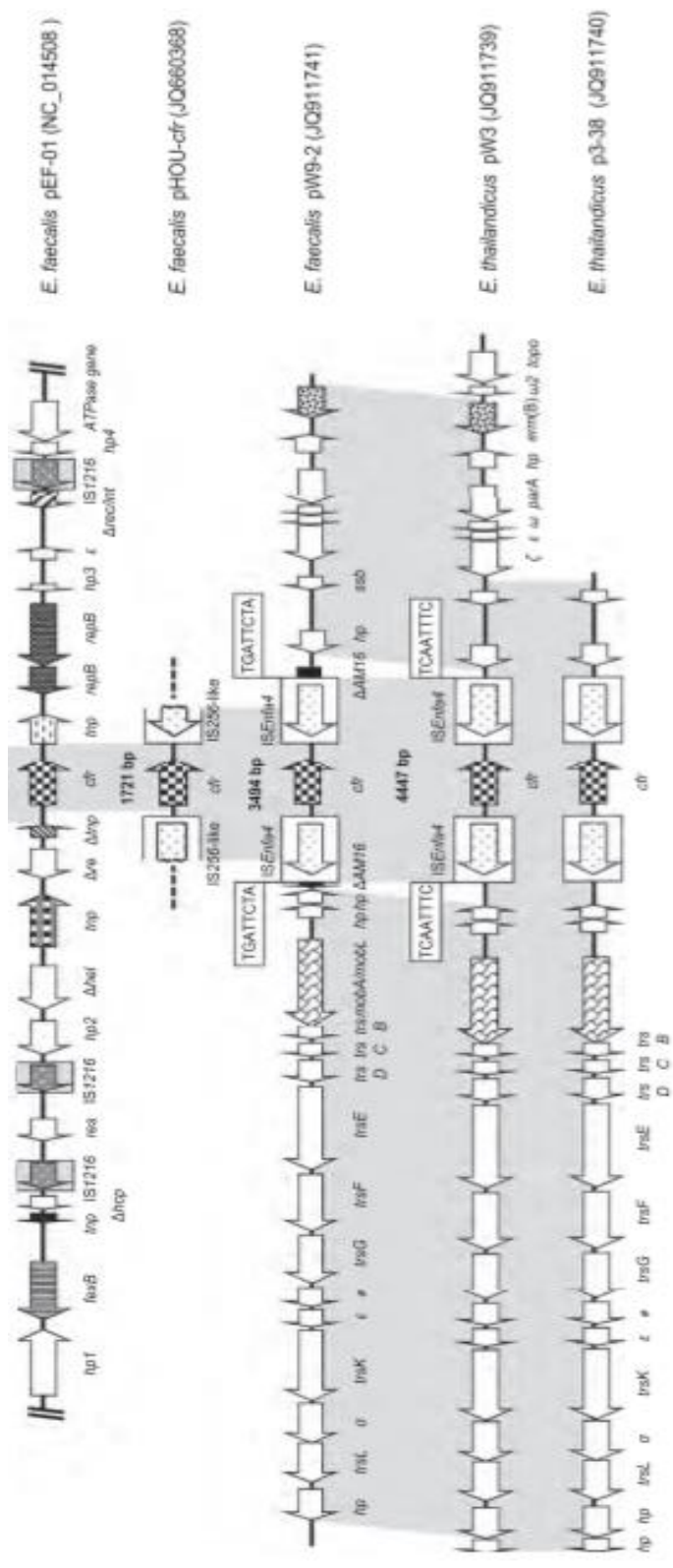
Le proteine Cfr appartengono alla superfamiglia delle S-adenosilmetionine (SAM) che includono proteine che generano specie radicali attraverso un clivaggio riduttivo (Sofia *et al.*, 2001). Le proteine appartenenti a questa superfamiglia sono coinvolte in una moltitudine di reazioni e di processi che includono: metilazione, isomerizzazione, ossidazione anaerobica e sintesi di poliammine. Il gene *cfr* codifica una metiltrasferasi che aggiunge un gruppo metile al nucleotide A2503 del dominio V dell'rRNA 23S. Cfr risulta essere la prima proteina SAM ad essere correlata a fenomeni di resistenza (Kehrenberg *et al.*, 2005). L'efficacia del tedizolid, oxazolidinone di seconda generazione, viene preservata in presenza del gene *cfr* (Singh *et al.*, 2019). Questo probabilmente è dovuto al fatto che la base A2503, sito di azione della metilasi Cfr, non è direttamente coinvolta nel legame con questo antibiotico (Fig. 7).



**Figura 7.** Confronto delle disposizioni spaziali nel sito di azione del linezolid e del tedizolid in assenza ed in presenza di metilazione indotta da Cfr. La metilazione crea un ingombro sterico (“steric clash” indicato dalla freccia bianca) che ostacola il posizionamento del linezolid (B) ma non del tedizolid (D) a causa delle differenti strutture delle catene laterali. In assenza di metilazione sia il linezolid (A) che il tedizolid (C) legano il sito di azione.

La localizzazione prevalente del gene è quella plasmidica anche se, più raramente, è stata descritta la sua presenza anche a livello cromosomico. Nei contesti genetici, il gene *cfr* è sempre fiancheggiato da elementi IS quali: IS256, ISEnfa4, IS21-558 e IS1216. Le IS, ampiamente diffuse nei Gram-positivi e nei Gram-negativi, sia a livello plasmidico che cromosomico, grazie al loro ruolo nei fenomeni di ricombinazione facilitano la diffusione del gene *cfr* (He *et al.*, 2014).

*cfr*, inizialmente identificato in stafilococchi coagulasi-negativi di origine animale, è particolarmente diffuso negli stafilococchi; complessivamente è stato descritto in 6 generi Gram-positivi (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) e in 2 generi Gram-negativi (*Proteus* ed *Escherichia*) (Shen *et al.*, 2013). La prima segnalazione di *cfr* in un isolato animale di *E. faecalis* risale al 2010 (Liu *et al.*, 2012) e, ad oggi, la sua diffusione in questo genere batterico appare relativamente modesta, quasi esclusivamente con una localizzazione plasmidica (Fig. 8). Prima di essere identificato in *E. faecalis*, un'origine enterococcica del contesto genetico di *cfr* era stata ipotizzata dopo sequenziamento del genoma del primo MRSA *cfr*-positivo (*S. aureus* CM05); secondo Toh *et al.*, infatti, l'ambiente genetico di *cfr*, a localizzazione plasmidica, si sarebbe integrato nel genoma di *S. aureus* CM05 (Toh *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Contesti genetici di *cfr* su plasmidi in enterococchi.

#### 1.2.4 Il Gene *cfr(B)*

Nel 2015, in uno studio condotto su ceppi di *Clostridium difficile*, viene identificata una nuova variante del gene *cfr*, denominata *cfr(B)* (Marín *et al.*, 2015). In realtà, il linezolid non viene prescritto per trattare le infezioni sostenute da *C. difficile*, tuttavia i clostridi, come gli enterococchi, fanno parte del microbiota intestinale e quindi possono fungere da serbatoio di geni di antibiotico-resistenza trasferibili (Penders *et al.*, 2013). La sequenza aminoacidica di Cfr(B) (349 aminoacidi) mostrava un'identità del 75.1% con quella depositata di Cfr di *S. sciuri*. In accordo con i criteri di classificazione e di nomenclatura, questi dati suggerivano l'esistenza di un nuovo gene di resistenza (Schwarz *et al.*, 2015).

In seguito, in due ceppi clinici di *E. faecium* con elevati valori di MIC di linezolid, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina, isolati da pazienti ospedalizzati nella città di New Orleans, vennero riscontrati due geni *cfr* che avevano un grado di identità del 74.9% con il *cfr* di *S. sciuri* e un'identità del 99.7% con i geni *cfr*-like riscontrati nelle specie clostridiali da



Marín *et al.*. Furono effettuati anche esperimenti di clonaggio in ceppi sensibili per verificare la funzionalità del gene *cfr*-like e venne confermata la relazione tra la presenza del gene e la comparsa del fenotipo di resistenza a linezolid, cloramfenicolo, clindamicina, retapamulina, quinupristin-dalfopristin e virginiamicina. Venne poi osservato che *cfr(B)*, pur mostrando un'identità nucleotidica del 75% con *cfr*, condivideva lo stesso dominio conservato e che quindi apparteneva alla stessa famiglia di S-adenosilmetionina-metiltrasferasi (Deshpande *et al.*, 2015).

Ulteriori studi hanno aggiunto informazioni circa questo gene: Bender *et al.* hanno rilevato *cfr(B)* in enterococchi clinici (Bender *et al.*, 2016), mentre Liu *et al.* ne segnalano la presenza in un ceppo di *E. faecalis* anche se fenotipicamente sensibile (Liu *et al.*, 2014).

Il gene *cfr(B)* è localizzato generalmente su elementi genetici mobili quali il trasposone Tn6218 integrato a livello cromosomico sebbene una sua variante sia stata riscontrata anche a livello plasmidico in ceppi clinici di *E. faecium* isolati nel 2016 in Germania (Bender *et al.*, 2016).

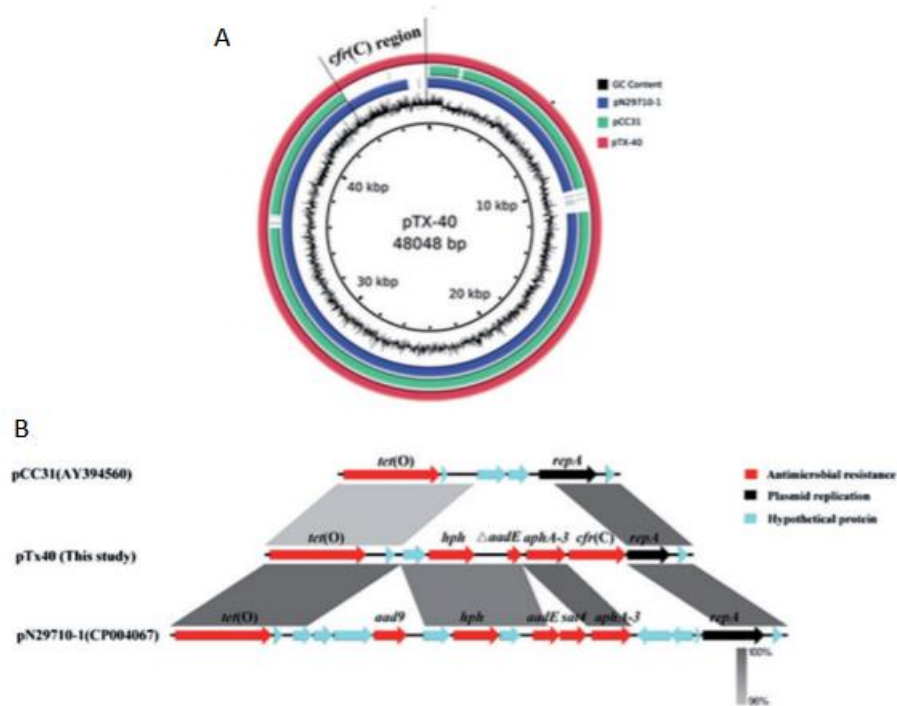
Sono richieste ulteriori indagini per comprendere appieno in che modo il gene diffonda e l'entità dei fenomeni coniugativi all'interno del genere *Enterococcus* e ad altre specie.

### **1.2.5 Il Gene *cfr(C)***

*cfr(C)* è stato individuato per la prima volta nel corso di un programma di sorveglianza delle antibiotico-resistenze su ceppi di *Campylobacter* condotto in cinque stati degli Stati Uniti. In un isolato di *Campylobacter coli* con elevati valori di MIC di cloramfenicolo e di florfenicolo, venne riscontrato un gene *cfr*-like localizzato su un plasmide coniugativo. I test di trasferibilità mostrarono che la resistenza a linezolid, fenicoli, lincosamidi e pleuromutiline (*Campylobacter* spp è naturalmente resistente alle streptogramine) era mobilizzabile a ceppi di *Campylobacter jejuni* e *C. coli* sensibili. Successivamente, tramite S1-PFGE e analisi di sequenza, venne identificato un plasmide (pTx40) di 48 kb contenente 47 ORF di cui 22 codificanti per proteine a funzione nota. Tra le ORF codificanti per proteine ipotetiche, l'attenzione cadde su un gene di 1.140 bp che codificava una proteina di 379 aminoacidi con

elevata similarità con le proteine SAM, tra le quali Cfr. Il confronto tra questa sequenza aminoacidica ipotetica e le sequenze depositate in GenBank di Cfr di *S. sciuri* e Cfr(B) di *E. faecium* indicò un grado di similarità significativo: 55.1% e 54.9%, rispettivamente. Si ipotizzò quindi che questa proteina potesse avere la capacità di conferire multiresistenza. Esperimenti di clonaggio confermarono la funzione del gene *cfr(C)* e il suo contributo al fenotipo di resistenza PhLOPSA in *Campylobacter* spp.

pTx40 mostrava elevata similarità di sequenza con due plasmidi di *C. coli*: pCC31 (45 kb) e pN29710-1 (55 kb) (Fig. 9). Rispetto a pCC31, in pTx40 era presente una regione aggiuntiva di probabile origine esogena in quanto caratterizzata da brusco cambio nel contenuto GC (43,8% contro 29,8%). In essa sono state rilevate 6 ORF di cui quattro codificanti per geni di resistenza, tra cui *cfr(C)*. La regione era presente anche in pN29710-1, ma risultava mancante del gene *cfr(C)* (Tang *et al.*, 2017).



**Figura 9.** A) Confronto tra le sequenze del plasmide pTx40 e dei plasmidi pCC31 e pN29710-1. Gli spazi bianchi indicano le sequenze di pTx40 assenti in pCC31 e pN29710-1, mentre in nero viene indicata la percentuale in GC.

**B)** Confronto tra il contesto genetico di *cfr(C)* in pTx40 e le sequenze dei plasmidi pCC31 e pN29710-1. Le aree di omologia sono riportate in toni di grigio in base al grado di similarità

Sempre nello stesso anno, venne pubblicato un articolo dove veniva studiato un gene *cfr*-like in clostridi con fenotipo PhLOPSA (*C. difficile* T10 e *Clostridium bolteae* 90B3); anche questo gene era identificato come *cfr(C)* ma risultava localizzato su un trasposone di 24 kb denominato Tn6314. L'elemento conteneva sequenze omologhe a geni codificanti per proteine implicate nella coniugazione e nella trasposizione come la relaxasi e le serina-

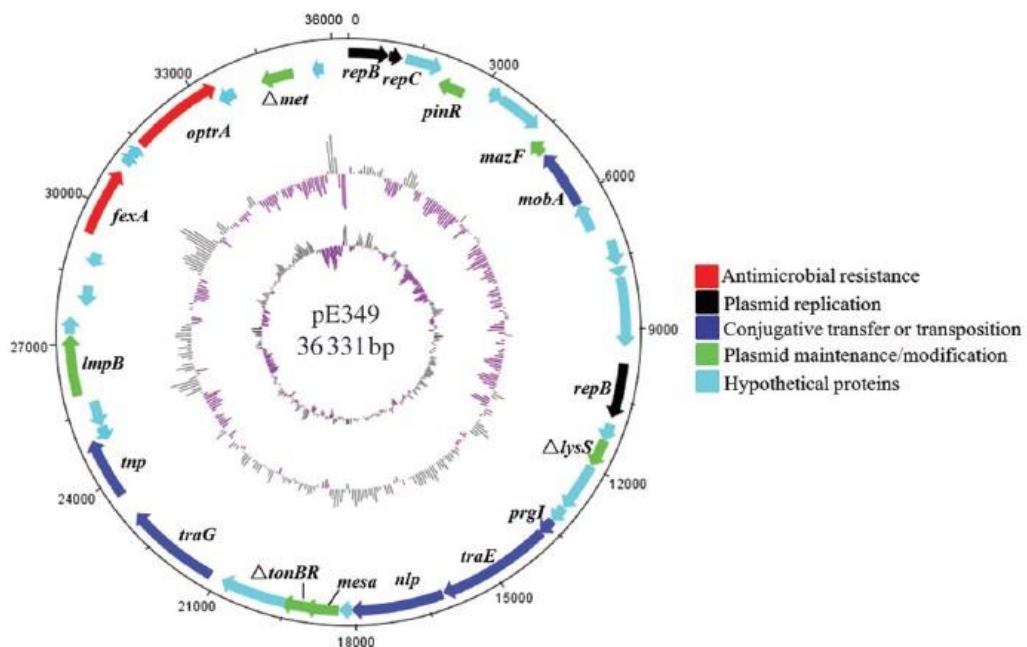
ricombinasi. Una proteina ipotetica di 416 aminoacidi possedeva una similarità del 50% con la sequenza di *cfr* depositata in GenBank. Anche in questo caso, il gene era in grado di conferire il fenotipo di resistenza PhLOPSA (Candela *et al.*, 2017).

L'elevata similarità di sequenza aminoacidica tra Cfr(C) e le proteine Cfr e Cfr(B) fece ipotizzare un meccanismo di azione simile. Nel 2019 si ebbe, infine, la conferma: Cfr(C) agisce metilando il C8 dell'A2503 dell'rRNA 23S. (Stojković *et al.*, 2019).

### **1.2.6 Il Gene *optrA***

Il gene *optrA* è stato descritto per la prima volta nel 2015 in ceppi di *E. faecalis* ed *E. faecium* isolati sia da pazienti ospedalizzati che da animali da allevamento in Cina. In questi studi sono stati analizzati enterococchi che mostravano resistenza ai fenicoli e agli oxazolidinoni in assenza sia mutazioni a carico dell'rRNA 23S o delle proteine ribosomiali, sia del gene *cfr*. Una preliminare caratterizzazione dell'elemento genetico coinvolto tramite S1-PFGE ed il suo successivo sequenziamento hanno portato

all'identificazione di un nuovo gene di resistenza agli oxazolidinoni localizzato su un plasmide coniugativo di circa 36 kb denominato pE349 (Fig. 10). All'interno del plasmide sono state individuate 39 ORF di cui 21 codificanti per proteine ipotetiche e 18 a funzione nota. L'analisi di sequenza ha condotto all'identificazione di un gene di 1.968 bp codificante per una proteina di 655 aminoacidi che presentava una similarità del 99.4% con le proteine della famiglia delle ABC-transporter protein (Wang *et al.*, 2015).



**Figura 10.** Rappresentazione schematica del plasmide pE439 di *E. faecalis* E349

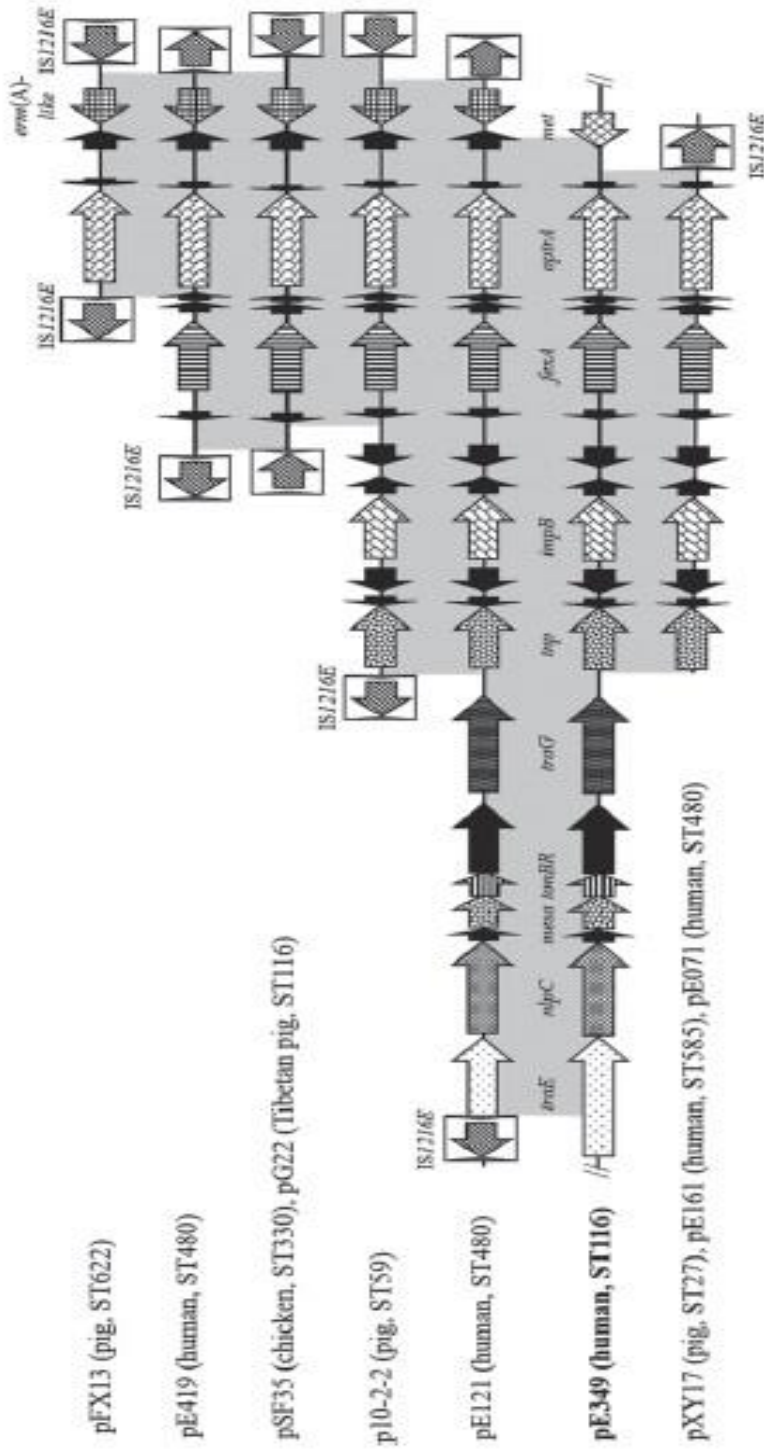
Le ABC-transporter sono una famiglia di proteine implicate in numerosi processi come il trasporto transmembrana di molecole, riparo del DNA, fenomeni di traduzione (Davidson *et al.*, 2008) e meccanismi di antibiotico-resistenza. Le proteine di questa famiglia spesso presentano subunità multiple delle quali una o due sono associate alle ATPasi e una o due sono transmembrana (Goffeau *et al.*, 2013). Nelle ABC-F, cui appartiene *optrA*, tuttavia, manca il dominio transmembrana. Le ABC-F, conferiscono resistenza a diverse classi di antibiotici attive sulla subunità ribosomiale 50S quali chetolidi, lincosamidi, macrolidi, oxazolidinoni, fenicoli, pleuromutiline e streptogramine di tipo A e B. Queste proteine, che agiscono attraverso un meccanismo di protezione del bersaglio, si legano alla subunità 50 S a livello del sito A proteggendo quindi il batterio dall'inibizione della traduzione prodotta dall'antibiotico (Sharkey *et al.*, 2016).

La presenza e l'espressione del gene in ceppi sensibili di *E. faecalis* e *S. aureus* erano associate alla comparsa di co-resistenza a fenicoli e oxazolidinoni. Le MIC di queste classi di farmaci, infatti, risultavano aumentate di 16 volte per i fenicoli e di 8 e 4 volte rispettivamente per il linezolid e per il tedizolid. Ciò ha suggerito

la denominazione *optrA* (oxazolidinones phenicols transferable resistance). Altri geni localizzati su pE349 erano *fexA*, anch'esso responsabile della resistenza ai fenicoli, *repB* e *repC* coinvolti nella replicazione plasmidica e *mobA*, *prgI*, *traE*, *tnp* e *traG*, associati a eventi di coniugazione.

Negli enterococchi *optrA*, spesso a localizzazione plasmidica, è fiancheggiato da sequenze di inserzione come IS1216 (He *et al.*, 2016) (Fig. 11). Le IS1216, riscontrate anche in associazione con *cfr* e *poxA*, appartengono alla famiglia delle IS6, che comprende sequenze di inserzione legate al trasferimento del gene di resistenza alla vancomicina *vanA* in *E. faecium* (Darini *et al.*, 2000) e del gene di resistenza agli oxazolidinoni *cfr*. Ciò ha indotto a ritenere che anche il gene *optrA* potesse essere trasferito tra diversi generi batterici grazie ad eventi di ricombinazione.





**Figura 11.** Confronto tra i contesti genetici di *optrA* in plasmidi di *E. faecalis*. Le aree evidenziate in grigio rappresentano le regioni con una identità di sequenza superiore al 98%

Sebbene prevalentemente a localizzazione plasmidica, *optrA* è stato rinvenuto anche a livello cromosomico in prossimità di trasposoni quali Tn558 e Tn554 (Chen *et al.*, 2019); questi elementi genetici sono in grado di escidersi e, attraverso la formazione di un intermedio circolare, integrarsi in una nuova sequenza target (Kehrenberg *et al.*, 2005). Più recentemente, in un ceppo di *E. faecalis* di origine suina, *optrA* è stato associato a un nuovo trasposone cromosomico della famiglia Tn554 denominato Tn6674, in associazione con altri geni di resistenza quali *spc*, *erm(A)* e *fexA*, (Li *et al.*, 2019).

*optrA* non è stato riscontrato solo in *Enterococcus* spp. ma anche in stafilococchi quali *S. sciuri* di origine suina (Fan *et al.*, 2016) e in streptococchi, come *S. suis* (Huang *et al.*, 2017) e *S. gallolyticus* (Mendes *et al.*, 2018). Nel 2020, *optrA* viene descritto per la prima volta in batteri Gram-negativi nel corso di una sorveglianza delle antibiotico-resistenze in *Campylobacter* spp. condotta in Cina nelle province di Guangdong e Shandong. Dallo studio è emerso che sei ceppi di *C. coli* erano positivi per *optrA* (Liu *et al.*, 2020).

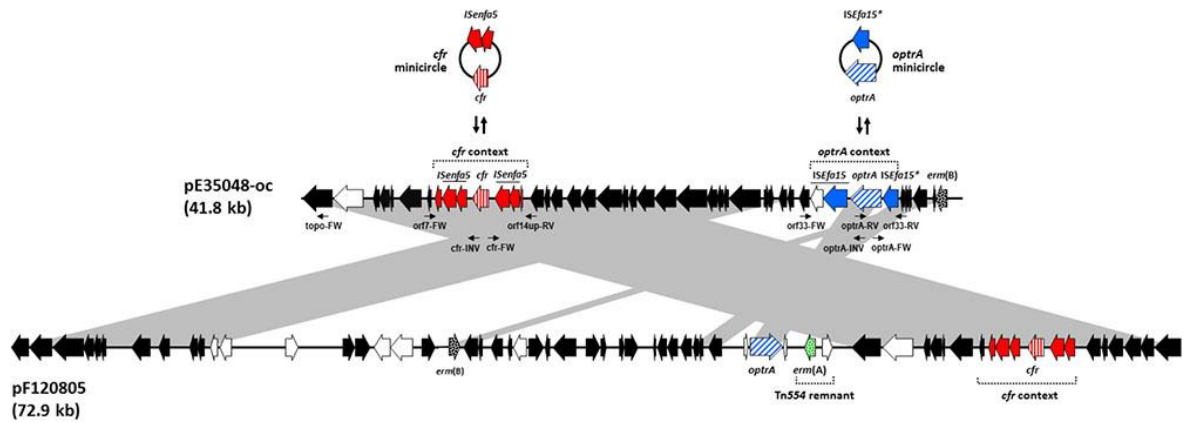
Altra caratteristica di *optrA* è la sua variabilità. In Cina sono state, infatti, descritte numerose varianti geniche rispetto al gene wild type di p349. Il numero di sostituzioni aminoacidiche evidenziate in tali varianti è comunque modesto, in genere tra le due e le tre, fino ad un massimo di sei (Cui *et al.*, 2016). Il primo riscontro di tale gene al di fuori della Cina è avvenuto nel 2016 in Italia in un isolato clinico di *E. faecium* (E35048) nel quale *optrA* era associato al gene *cfr* in forma silente (Brenciani *et al.*, 2016). Il confronto con varianti riscontrate in Cina ha evidenziato che la variante italiana mostrava una variabilità significativamente maggiore differendo di 20 sostituzioni aminoacidiche rispetto ad *optrA* wild type di E349 (Morrone *et al.*, 2017).

### **1.2.7 Co-localizzazione dei Geni *cfr* e *optrA***

Il gene *optrA* è stato riscontrato insieme al gene *cfr* in due isolati clinici strettamente correlati di *E. faecium* in Italia (Brenciani *et al.*, 2016). L'analisi del ceppo *E. faecium* E35048 ha permesso di evidenziare la localizzazione dei due geni ad una distanza di 23,1 kb su un plasmide di 41.816 bp, indicato pE35048-oc. Su tale

plasmide era presente anche il gene *erm(B)* per la resistenza ai macrolidi. pE35048-oc mostrava elevata similarità (identità del 96%) con il plasmide pRE25. *optrA* era localizzato sul trasposone Tn6628, integrato nel gene codificante per la Zeta Toxin Protein, mentre il gene *cfr* era inserito nel gene *inu(E)* fiancheggiato da due elementi *ISEnfa5*, sequenze di inserzione della famiglia IS21, codificanti per una trasposasi ed una proteina helper che promuovono l'escissione in forma circolare delle sequenze. Entrambi i contesti genetici erano in grado di escindersi.

Sempre in *E. faecium* è stata riportata una co-localizzazione dei due determinanti di resistenza sul plasmide pEF-12-0805 (72,9 kb), anch'esso con elevata similarità con pRE25 (Lazaris *et al.*, 2017). Il contesto *optrA*, associato al trasposone Tn554 che porta il gene di resistenza *erm(A)*, non era in grado di escindersi per l'assenza di sequenze di inserzione. *cfr*, invece era fiancheggiato da sequenze *ISEnfa5* come osservato in p-E35048 (Fig. 12).



**Figura 12.** Rappresentazione schematica e confronto dei contesti *cfr* e *optrA* in *pE35048-oc* di *E. faecium* E35048 e in *pF120805* di *E. faecium* F120805

Entrambi i geni sono stati riscontrati anche sul plasmide pWo28-3 (60 kb) di *S. sciuri* (Li *et al.*, 2016).

*cfr* e *optrA* conferiscono resistenza con meccanismi differenti a diverse classi di antibiotici e la loro co-localizzazione su plasmidi è motivo di preoccupazione in relazione alla loro eventuale diffusione. Inoltre, negli enterococchi è stato osservato che plasmidi non coniugativi possono essere mobilizzati da plasmidi coniugativi (Di Sante *et al.*, 2017).

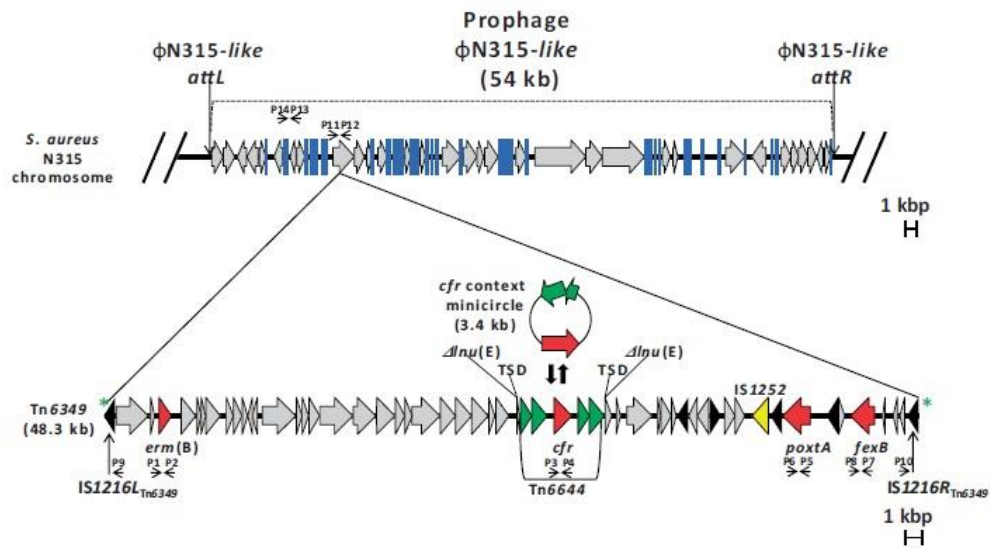
### 1.2.8 Il Gene *poxtA*

*poxtA* è stato identificato per la prima volta nel 2018 in un MRSA resistente al linezolid in associazione con i geni di resistenza *flexB*, *erm(B)* e *cfr*. Il ceppo, MRSA AOUC-0915, era stato isolato da un paziente ospedalizzato con fibrosi cistica sottoposto a trattamento con linezolid. L'analisi del genoma mediante WGS aveva rilevato la presenza di una ORF codificante per una proteina di 542 aminoacidi con una similarità di circa il 32% con il gene *optrA*.

La proteina PoxTA fa parte della superfamiglia ARE ABC-F, cui appartiene anche Optra, proteine note per la capacità di conferire resistenza ai fenicoli e oxazolidinoni attraverso un meccanismo di protezione del bersaglio ribosomiale. Per valutare la capacità di conferire resistenza al linezolid, sono stati effettuati esperimenti di trasferimento a ceppi sensibili di *E. coli*, *S. aureus* ed *E. faecalis*. L'espressione del gene nei riceventi era associata ad un decremento significativo della sensibilità ai fenicoli, oxazolidinoni (linezolid e tedizolid), e tetracicline; in considerazione di ciò questo gene è stato nominato *poxtA* (Phenicol, Oxazolidinones, Tetracyclines). Il gene *poxtA* risultava compreso tra due elementi IS1216-like con lo

stesso orientamento suggerendo una possibile mobilizzazione genica (Antonelli *et al.*, 2018).

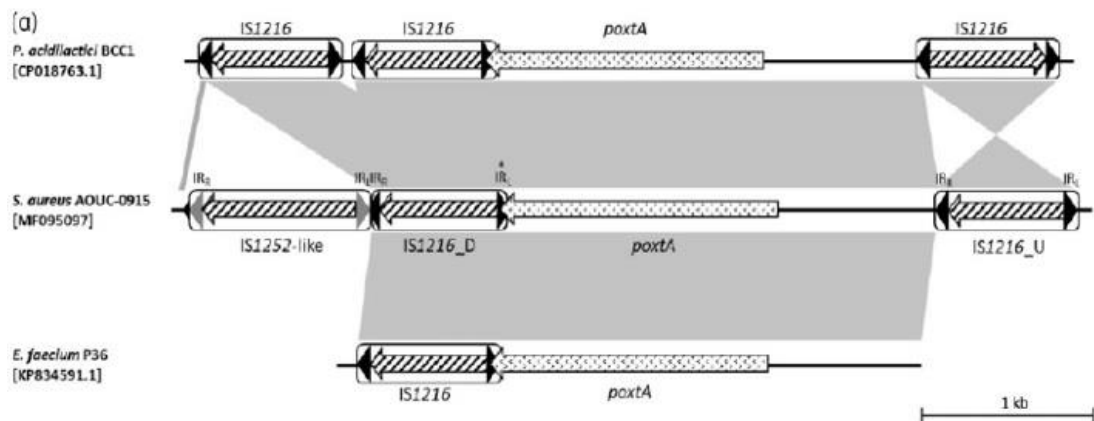
Ulteriori studi hanno chiarito in maggior dettaglio il suo contesto genetico. *poxA* risultava localizzato su un trasposone a localizzazione cromosomica denominato Tn6349, a sua volta integrato all'interno del profago  $\phi$ N315-like (54 kb) in corrispondenza del gene che codifica una ATPasi (Fig. 13). Nello studio, inoltre, si ipotizza che Tn6349 possa essere il risultato della ricombinazione tra Tn6657 con un plasmide pE35048-oc-like e successiva integrazione nel profago  $\phi$ N315-like. Tn6657 sarebbe quindi responsabile della presenza dei geni *poxA* e *fexB* mentre pE35048-oc-like dei geni *erm(B)* e *cfr* (D'Andrea *et al.*, 2019).



**Figura 13.** Rappresentazione schematica della locazione dei geni di resistenza *cfr*, *poxA*, *fexB* e *erm(B)* in Tn6349, a sua volta integrato nel profago  $\phi$ N315-like

La ricerca di *poxA* nelle banche dati ha consentito di evidenziarne la presenza in altri batteri Gram-positivi come *E. faecium* P36, e *Pediococcus acidilactici* BCC1. Nel caso di *E. faecium* P36 è stata riscontrata una sola copia di IS1216 a valle di *poxA*, mentre nel caso di *P. acidilactici* BCC1 la IS1216 a monte del gene aveva orientamento opposto rispetto a quella descritta in MRSA AOUC-0915 (Fig. 14).





**Figura 14.** Rappresentazione schematica dei contesti genetici di *poxtA* in *S. aureus* AOUC-0915, *E. faecium* P36 e *P. acidilactici* BCC1

*poxtA* è stato riscontrato anche in ceppi di *E. faecalis* e di *E. faecium* isolati da pazienti ospedalizzati in Irlanda (Egan *et al.*, 2019) ed in Grecia (Papagiannitsis *et al.*, 2019).

Immediatamente dopo la sua scoperta, *poxtA* è stato identificato, sempre in Italia, anche in un *E. faecium* di origine suina (Brenciani *et al.*, 2019). Successivamente molti altri studi hanno confermato la sua presenza in enterococchi di isolamento animale in molti Paesi (Lei *et al.*, 2019) (Elghaieb *et al.*, 2019).

Una localizzazione plasmidica di *poxtA* è stata segnalata in un isolato di *E. faecalis* di origine suina; sul plasmide erano presenti altri geni di resistenza tra cui *oprA* (Hao *et al.*, 2019).

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Campionamento ed Isolamento**

La ricerca di ceppi florfenicolo-resistenti è stata eseguita su campioni fecali di ovini e bovini raccolti nell'ambito del progetto "Rumina". Il progetto, coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", sede di Teramo (IZS di Teramo), ha lo scopo di monitorare la diffusione delle antibiotico-resistenze in *Campylobacter* spp.

Il campionamento è stato effettuato in allevamenti da ingrasso dislocati nelle regioni Abruzzo e Molise. Le aziende di norma acquistano animali da società agricole locali o di regioni limitrofe, ma in alcuni casi anche da aziende produttrici estere. Gli allevamenti da ingrasso si occupano di portare a termine il ciclo di accrescimento degli animali fino all'età della macellazione con conseguente lavorazione e distribuzione nel settore alimentare o vendita dei capi ad aziende terze. Il campionamento è stato effettuato prevalentemente da animali in fase post-svezzamento che

risulta in genere la più soggetta a somministrazione di antibiotici. In ciascun allevamento sono stati prelevati, in punti diversi dello stabilimento, un numero variabile da 1 a 5 di pool di feci per capo in relazione dell'estensione dell'allevamento e al numero di animali presenti.

Ciascun campione fecale era inoculato in 5 ml di acqua peptonata con florfenicolo (10 mg/L) ed incubato 37°C per 24 ore. Successivamente si procedeva con la semina, tramite ansa calibrata da 10 µl, su Slanetz-Bartley Agar addizionato con florfenicolo (10 mg/L) ed incubazione a 37 °C per 24-48 h.

## **2.2 Antibiotici e Test di Sensibilità**

Presso l'IZS di Teramo il profilo di sensibilità dei ceppi è stato analizzato impiegando "Sensititre Antimicrobial Susceptibility Testing System" fornito dalla ditta Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Il sistema prevede inizialmente l'allestimento di una sospensione batterica in acqua distillata fino al raggiungimento della torbidità di 0.5 McFarland mediante lettura spettrofotometrica. Successivamente 10 µl della sospensione

vengono inoculati in 5 ml di Mueller-Hinton brodo. Utilizzando un dispensatore automatico, 100 µl di sospensione sono inoculati in ciascun pozzetto di una “Sensititre EU Surveillance EUVENC Plate” contenente un set di antibiotici liofilizzati selezionati per gli enterococchi: vancomicina, teicoplanina, quinipristina/dalfopristina, tetraciclina, daptomicina, ciprofloxacina, eritromicina, tigeciclina, linezolid, gentamicina, ampicillina e cloramfenicolo. Dopo una fase di incubazione a 37° per 24 h, la lettura è svolta manualmente attraverso il sistema di visualizzazione *Sensititre Vizion (V2021)*.

Presso i laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente dell’Università Politecnica delle Marche sono state determinate mediante microdiluizione in brodo le MIC di linezolid, florfenicolo, cloramfenicolo e tetraciclina (Sigma-Aldrich Co, Milano, Italia). Le polveri degli antibiotici sono state dapprima risospese nei rispettivi solventi fino alla concentrazione finale di 10 g/L e successivamente conservate ad una temperatura di -20°C.

La sensibilità al tedizolid è stata saggiata mediante *E-test*. Le strip necessarie per l’esecuzione del test sono state fornite dalla ditta

Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italia). In questo caso una sospensione in brodo Mueller-Hinton di approssimativamente  $1 \times 10^8$  CFU/ml è stata inoculata con tampone su piastre di Mueller-Hinton Agar con successivo posizionamento della strip contenente tedizolid ed incubazione a 37 °C per 24 ore. Come controllo è stato utilizzato il ceppo *E. faecalis* ATCC 29212.

I valori di MIC sono stati interpretati conformemente ai breakpoint pubblicati dal CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e dall'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

### **2.3 Estrazione DNA Totale**

L'estrazione del DNA batterico totale è stata effettuata attraverso l'estrattore automatico per acidi nucleici "Maxwell System 16" fornito dalla ditta Promega (Madison, USA) che sfrutta biglie magnetiche per la sua estrazione e purificazione (Fig. 15). I passaggi manuali sono ridotti all'inserimento delle colonie nell'apposito pozzetto della cartuccia fornita dalla ditta e

nell'allestimento di una provetta di raccolta con 300 µl di tampone di eluizione presente con il kit.

Il funzionamento è molto semplice: la cartuccia destinata ad ogni estrazione è composta da diversi pozzetti già contenenti la corretta quantità di reagenti necessari per ciascuna fase del protocollo di reazione. L'estrazione si articola in sette passaggi: dopo l'introduzione del campione, vengono effettuati un lavaggio di lisi e cinque lavaggi con alcool. Il sistema è realizzato in modo che la cartuccia rimanga ferma, l'unico elemento mobile all'interno del "Maxwell" è un'asticella metallica che può essere magnetizzata; essa permette il trasposto delle biglie magnetiche da un serbatoio all'altro della cartuccia. Al termine di ogni passaggio del protocollo, il campo magnetico della barra viene attivato e le biglie vengono raccolte e prelevate dal pozzetto in cui si trovano. Quando poi l'asta arriva in corrispondenza del serbatoio successivo le microbiglie vengono rilasciate e si procede con un nuovo lavaggio degli acidi nucleici. Il DNA purificato è quindi eluito mediante 300 µl di tampone di eluizione. La conservazione del DNA è stata effettuata a 4°C.



**Figura 15.** *Il sistema Maxwell System 16 (Promega)*

Le estrazioni presso il Laboratorio di Microbiologia di dell'UNIVPM sono state effettuate con utilizzando il kit “GenElute Bacterial Genomic DNA” (Sigma-Aldrich Co, Milano, Italia). Dopo una incubazione a 37°C per 24 ore, le brodoculture sono state centrifugate a 13.000 g per 2 minuti. Il pellet veniva prima risospeso in 200 µl di “Lysozime Solution” (45 mg/ml) e successivamente incubato 1 h a 37°C. A questo punto venivano aggiunti 200 µl di “Lysis Solution” e 20 µl di Proteinasi K per ottenere la lisi cellulare e la digestione proteica. Seguiva una incubazione a 55°C per 10 minuti. Per la precipitazione del DNA sono stati usati 200 µl di etanolo assoluto con successiva agitazione con vortex. La soluzione era quindi posta all'interno delle

colonnine fornite con il kit e centrifugata a 6.500 g per 1 minuto. Seguivano due lavaggi con 500 µL di “Wash Solution”. Infine, le colonnine venivano poste in provette di raccolta e, dopo l’aggiunta di 200 µl di “Elution Solution” e centrifugazione a 6.000 g per 1 minuto, veniva raccolto il DNA. Il DNA estratto era conservato a -20°C.

## **2.4 Saggi di Amplificazione**

Gli enterococchi florfenicolo-resistenti, selezionati sul *Slanetz-Bartley* con florfenicolo (10 mg/ml), sono stati saggiati mediante PCR per la presenza dei geni di resistenza *cfr*, *optrA* e *poxxA*.

L’analisi è stata effettuata utilizzando il “QIAGEN Multiplex Pcr Kit” fornito dalla ditta Qiagen (Hilden, Germania). Il mix di reazione utilizzato per ciascun campione era come di seguito riportato: 25 µl di Master Mix 2x Qiagen, 18 µl di H<sub>2</sub>O, 1 µl di primer forward, 1 µl di primer reverse. Al mix venivano aggiunti 5 µl di DNA del ceppo in esame per un volume totale di 50 µl.

I primer utilizzati sono riportati in Tabella 1.



<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenza (5' -&gt;3')</b>	<b>Amplicon (bp)</b>
<i>cfr</i>	cfr-fw	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746
	cfr-rv	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	
<i>optrA</i>	optrA-fw	GCTGATAGATAAAAATGGAGAAT	1.035
	optrA-rv	TGAGCAAGCTGTTGGTCAAAT	
<i>poxtA</i>	poxtA-fw	GAACGCTTGGAGTATTTCTGACTTC	778
	poxtA-rv	CTGGACTGAGAATACCCATCATC	

**Tabella 1.** *Primer utilizzati*

Le condizioni di PCR utilizzate sono di seguito riportate:

gene *cfr*: denaturazione iniziale a 94°C per 5', 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30", annealing a 67° per 30", allungamento a 72°C per 45" e allungamento finale a 72°C per 5'.

gene *optrA*: denaturazione iniziale a 94°C per 5', 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30", annealing a 57°C per 30", allungamento a 72°C per 60" e allungamento finale a 72°C per 5'

gene *poxA*: denaturazione iniziale a 94°C per 5', 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30", annealing a 67° per 30", allungamento a 72°C per 45" e allungamento finale a 72°C per 5'

I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1% in TAE (Tris Acetato EDTA) e applicando una corrente di 80 Volt. Come marker sono stati utilizzati: "GeneRule 100b DNA Ladder" e "GeneRule 1 kb DNA Ladder" (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

## **2.5 Saggi di Trasferibilità**

Gli enterococchi in esame sono stati utilizzati come donatori in esperimenti di coniugazione su filtro per valutare la mobilità e il tasso di trasferibilità dei geni di resistenza al linezolid. Come riceventi sono stati usati *E. faecium* 64/3 (Werner 97) ed *Streptococcus pyogenes* 12RF, ovvero ceppi di laboratorio sensibili al linezolid e al florfenicolo, ma resistenti all'acido fusidico e alla rifampicina. Donatori e riceventi erano inoculati in Brain Heart Infusion (BHI) brodo fino al raggiungimento di una densità ottica OD<sub>675</sub> di 0,4. Erano quindi filtrati nel rapporto 1:1

impiegando un sistema di filtrazione con filtri di nitrocellulosa con pori di 0,45  $\mu\text{m}$  (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania). Successivamente il filtro veniva rimosso sterilmente, posizionato su una piastra preriscaldata di BHI agar, ed incubato a 37 °C per 24 ore. Per rimuovere i batteri dalla sua superficie del filtro veniva eseguito un lavaggio in 10 ml di soluzione fisiologica con successiva agitazione con vortex. La sospensione veniva quindi centrifugata per 10 minuti a 8.000 rpm per raccogliere il pellet batterico che era risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. A questo punto venivano effettuate delle diluizioni scalari fino a  $10^{-15}$  per la conta delle CFU/ml di donatore e ricevente mediante spatolamento di 100  $\mu\text{l}$  di ciascuna diluizione su piastre selettive contenenti florfenicolo (10 mg/L) o acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Dalle provette, dall'intero alla diluizione  $10^{-5}$ , sono stati prelevati e piastrati 100  $\mu\text{l}$  in piastre di BHI contenenti florfenicolo (10 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L) per la selezione dei transconiuganti. Dopo 24-48 h a 37 °C, si procedeva con la conta delle colonie per determinare le frequenze di trasferimento, espresse come numero di CFU/ml, in funzione del ricevente. Infine, i transconiuganti

venivano saggiati mediante PCR per la presenza di geni di linezolid-resistenza e per la loro sensibilità a florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tedizolid.

## **2.6 S1-PFGE**

La tecnica della S1-PFGE è eseguita per una preliminare analisi del plasmidoma batterico. Un ml della brodocoltura overnight (ad una concentrazione di DNA pari a 10 µg/ml) era prima centrifugato e poi lavato con 0,5 ml di soluzione Tris EDTA NaCl (TEN Buffer). Al pellet risospeso in 0,5 ml di TEN Buffer veniva aggiunto un volume equivalente di low-melting agarose (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1,6%. Poiché il DNA cromosomico può danneggiarsi facilmente, il protocollo per PFGE prevede che le cellule batteriche vengano incluse in blocchetti di agarosio. Per ottenere tali blocchetti (plug), la sospensione batterica in agar era colata in speciali stampi, le “plug-mold”, con conseguente solidificazione. Seguiva un'incubazione per 24 h a 37°C previa aggiunta di 5 ml di un tampone di lisi (Sigma-Aldrich Co, Milano, Italia) contenente lisozima (1mg/ml) e RNasi A (50 µg/ml). Al termine

dell'incubazione, ad ogni plug erano aggiunti 3 ml di “Digestion Buffer” contenente Proteinasi K alla concentrazione di 0,5 µg/ml.

Si procedeva quindi ad una nuova incubazione a 50°C per 24 ore. Le plug erano sottoposte a 3 lavaggi con 10 ml di Tris EDTA (TE Buffer), poi il DNA in esse contenuto era digerito ponendo metà plug in incubazione overnight in una soluzione con 30 U di enzima di restrizione S1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Per bloccare la digestione veniva aggiunto 1 ml di EDTA 0,5 M. Successivamente le plug venivano posizionate in appositi pettini ed incluse nel gel “Pulsed Field Certified Agarose” (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1%. Il gel era quindi posto nella camera elettroforetica “Chef Mapper XA System” (Bio-Rad, Hercules, USA), immerso in un tampone di Tris Borato EDTA (TBE Buffer). L'apparato utilizzato per la corsa elettroforetica è del tipo “Contour-clamped Homogeneous Electric Field” (CHEF) in cui gli elettrodi sono disposti ad esagono nella vasca in modo da generare un campo elettrico con angolo di 120° in tutte le parti del gel.

La corsa elettroforetica aveva una durata complessiva di 22 ore con campo elettrico di 6V/cm, “switch time iniziale” di 1 secondo, “switch time finale” di 20 secondi e “ramping factor” lineare. Per

quanto riguarda i pesi molecolari sono stati usati: “Lambda Marker” (Promega, Madison, USA) e “Low Range PFG Marker” (New England Biolabs, Ipswich, USA). Per consentire la visualizzazione delle bande ottenute, il gel è stato prima colorato tramite una soluzione di bromuro di etidio (0,5 µg/ml) e quindi posto su un transilluminatore.

## **2.7 Southern Blotting e Ibridazione**

La localizzazione genica e una preliminare valutazione del plasmidoma batterico sono state dedotte attraverso esperimenti di Southern Blotting ed ibridazione con sonde specifiche per i geni di resistenza al linezolid. I frammenti prodotti dall'enzima S1, successivamente separati tramite PFGE, sono stati trasferiti su membrana di nylon attraverso trasferimento capillare. Si è proceduto quindi ad un passaggio di depurinazione e di denaturazione del gel necessario per la successiva ibridazione delle singole catene di DNA con la sonda marcata. Il gel è stato posto a contatto con la membrana con sopra una pila di fogli di carta assorbente. Per ottenere il trasferimento è stato posto il tutto in un

contenitore con l'apposito tampone che per capillarità attraversa il gel verso i fogli di carta assorbente consentendo il trasferimento dei frammenti di DNA alla membrana di nylon con i quali instaurano legami di natura elettrostatica. La membrana è stata quindi separata dal gel e sono seguiti un passaggio di fissazione del DNA alla membrana, attraverso irradiazione con UV, ed una fase di pre-ibridazione in tampone "Ultra-hyb" per 2 h a 50 °C per saturare le cariche positive. È seguita l'ibridazione con l'aggiunta di una sonda marcata con biotina precedentemente denaturata a 100°C per 10 minuti. Membrana e sonda sono state a contatto overnight e in leggera agitazione. Le sonde, allestite con i prodotti di PCR, sono state marcate con biotina tramite il kit "Psoralen-Biotin BrightStar" (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Una volta ultimata l'ibridazione, la sonda in eccesso è stata rimossa tramite una successione di lavaggi a forza ionica decrescente tramite una soluzione salina con sodio citrato (SCC Buffer) e Sodio-dodecil-solfato (SDS). Per la rilevazione delle sonde marcate con biotina è stato usato il kit fornito dalla ditta che sfrutta l'elevata affinità di legame della streptavidina per la biotina e si basa sulla produzione di un segnale luminoso capace di

impressionare una lastra fotografica. Dopo una serie di lavaggi in appositi tamponi avviene, infatti, l'incubazione della membrana in camera oscura per 2 ore con successiva lettura.



## **3.RISULTATI**

### **3.1 Isolamento di Ceppi Florfenicolo-Resistenti e Screening per la Presenza di Geni di Resistenza agli Oxazolidinoni**

La ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti è stata effettuata in due momenti successivi.

In una prima fase, 99 campioni fecali (53 da bovini e 46 da ovini) sono stati inoculati su Slanetz-Bartley, procedura che ha consentito l'isolamento di 263 enterococchi. I ceppi, conservati in terreno a becco di clarino, sono stati successivamente seminati su piastre di Slanetz-Bartley supplementate con florfenicolo (10 mg/L). Questo approccio sperimentale ha consentito di recuperare un numero molto basso di enterococchi florfenicolo-resistenti (n=6). Inoltre, nessuno dei 6 isolati, testati mediante PCR per la presenza di geni di linezolid-resistenza, è risultato essere positivo. Questo risultato è stato correlato con il fatto che i campioni fecali sono stati seminati direttamente sulle piastre di Slanetz-Bartley prive di florfenicolo e non si è proceduto ad un arricchimento in acqua

peptonata con florfenicolo (10 mg/L), step consigliato da molti autori, prima della semina su terreno agarizzato con florfenicolo.

In una seconda fase, sono stati analizzati 66 campioni fecali (18 da bovini e 48 da ovini). Dopo arricchimento overnight dei campioni in acqua peptonata con florfenicolo (10 mg/L) e successiva semina su Slanetz Bartley con florfenicolo (10 mg/L) è stato possibile isolare 12 ceppi florfenicolo-resistenti di cui 6 di origine bovina e 6 di origine ovina. Tutti e 12 i ceppi florfenicolo-resistenti sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei geni di resistenza agli oxazolidinoni (*cfr*, *optrA* e *poxA*).

Due ceppi florfenicolo-resistenti, entrambi isolati da bovini, sono risultati positivi per la presenza di geni di linezolid-resistenza: il ceppo 24903-1C aveva genotipo *optrA/poxA*, mentre l'isolato 1417-4A era positivo per il gene *optrA*.

### **3.2 Test di Sensibilità ed Identificazione**

I due isolati sono stati saggiati per la loro sensibilità a: ampicillina, cloramfenicolo, ciprofloxacina, daptomicina, eritromicina, gentamicina, linezolid, quinupristin/dalfopristin, teicoplanina,

vancomicina, tetraciclina e tigeciclina. In Tabella 2 sono riportati i valori di MIC dei diversi antibiotici relativi ai due ceppi.

L'isolato 1417-4A mostrava un valore di MIC di linezolid di 4 mg/L che cade nel range della sensibilità, mentre il ceppo 24903-1C, che aveva una MIC di linezolid di 8 mg/L, risultava resistente.

<b>Antibiotico</b>	<b>MIC (mg/L)</b>	
	<b>24903-1C</b>	<b>1417-4A</b>
Ampicillina	4	≤ 0.5
<b>Cloramfenicolo</b>	<b>64</b>	<b>32</b>
Ciprofloxacina	4	2
Daptomicina	16	≤ 0.25
Eritromicina	> 128	>128
Gentamicina	16	≤ 8
<b>Linezolid</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
<b>Tedizolid</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
Quinupristin/dalfopristin	8	4
Teicoplanina	1	≤ 0,5
Vancomicina	≤ 1	≤ 1
Tetraciclina	> 128	≤ 1
Tigeciclina	0.5	0.25

**Tabella 2.** Profili di sensibilità a 14 antibiotici dei ceppi 24903-1C e 1417-4A

Le MIC di tedizolid, determinate tramite E-Test, erano di 3 mg/L per l'isolato 24903-1C e di 1 mg/L per l'isolato 1417-4A.

L'identificazione a livello di specie dei due isolati è stata eseguita mediante Vitek2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) presso i laboratori di Batteriologia e Igiene delle Produzioni Lattiero-Casarie dell'Istituto Zooprofilattico di Teramo.

Il ceppo 24903-1C era identificato come *E. faecium*, mentre il secondo isolato, 1417-4A, come *Aerococcus viridans*.

L'identificazione di quest'ultimo è stata confermata mediante tecnologia MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux) presso i laboratori di Malattie Infettive dell'UNIVPM.

Quest'ultimo dato è particolarmente interessante in quanto, ad oggi, non è mai stata segnalata la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in questo genere batterico.

### **3.3 Trasferibilità dei Geni *optrA* e *poxTA***

La capacità di trasferimento dei geni *optrA* e *poxTA* è stata valutata mediante esperimenti di coniugazione su filtro in cui i due isolati, *E. faecium* 24903-1C ed *A. viridans* 1417-4A, sono stati usati come donatori. Negli incroci di *E. faecium* 24903-1C è stato impiegato come ricevente *E. faecium* 64/3, un ceppo di laboratorio sensibile al florfenicolo ma resistente alla rifampicina e all'acido fusidico. Per quanto riguarda *A. viridans* 1417-4A si è deciso di utilizzare come ricevente uno streptococco dal momento che i due generi batterici risultano più affini. *A. viridans* 1417-4A è stato pertanto incrociato con *Streptococcus pyogenes* 12RF, un mutante resistente alla rifampicina e all'acido fusidico, ma sensibile al florfenicolo.

*E. faecium* 24903-1C era in grado di co-trasferire i geni *optrA* e *poxA* ad *E. faecium* 64/3 con elevata frequenza di trasferimento:  $2,9 \times 10^{-3}$  CFU per ricevente. I transconiuganti ottenuti dimostravano di aver acquisito entrambi i geni e avevano valori di MIC di florfenicolo e linezolid riportati in Tabella 3.

Al contrario, *A. viridans* 1417-4A, non si dimostrava in grado di trasferire il gene *optrA* a *S. pyogenes* 12RF ricevente. L'esperimento era ripetuto tre volte.

Donatore	Ricevente	Frequenza di trasferimento	Genotipo		MIC				
					FFC	CHL	LZD	RIF	FUS
<i>A. viridans</i> 24903-1C	<i>S. pyogenes</i> 12RF	NR <sup>a</sup>	<i>optrA</i>		16	32	4	0.125	4
<i>E. faecium</i> 1417-4A	<i>E. faecium</i> 64/3	$2,9 \times 10^{-3}$	<i>optrA</i>	<i>poxA</i>	128	64	8	2	4
TC-1 <sup>b</sup>			<i>optrA</i>	<i>poxA</i>	64	32	4	>32	>32
TC-2			<i>optrA</i>	<i>poxA</i>	64	32	4	>32	>32

<sup>a</sup>NR: non rilevabile

<sup>b</sup>TC: transconiuganti

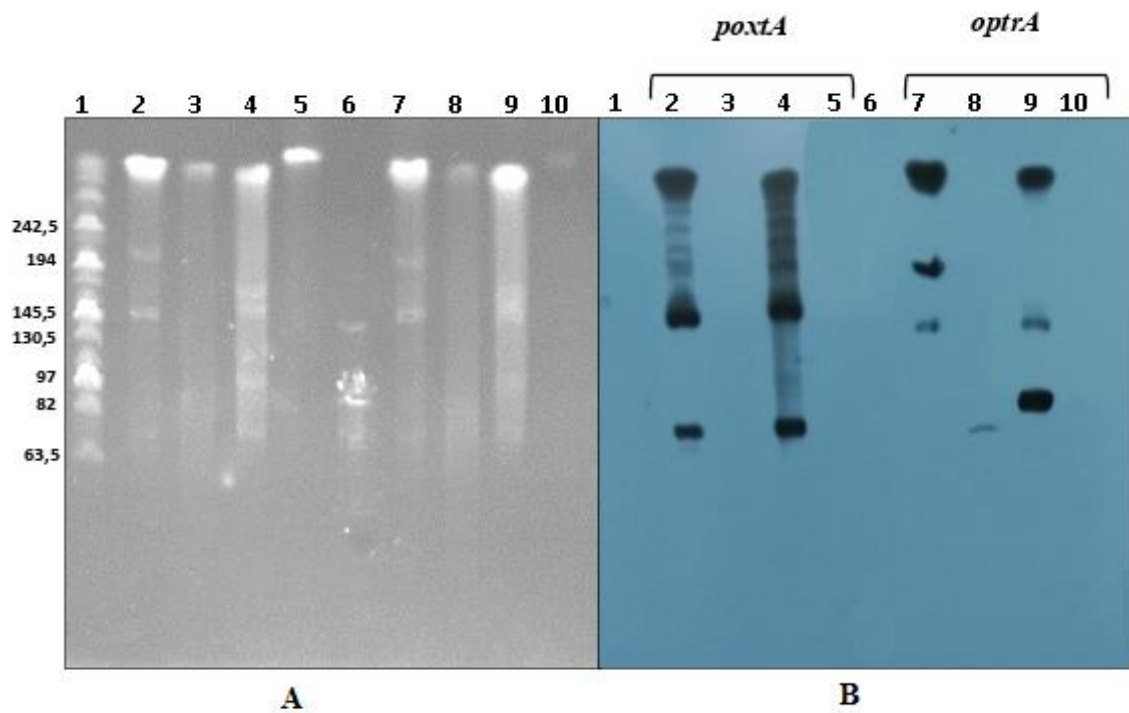
**Tabella 3.** Genotipo e fenotipo dei donatori e dei transconiuganti ottenuti e frequenza di trasferimento

### 3.4 Localizzazione Genica

Gli esperimenti di S1-PFGE, southern blotting ed ibridazione hanno consentito di chiarire la localizzazione (cromosomica e/o plasmidica) dei determinanti di resistenza al linezolid nei due isolati. Questo approccio sperimentale ha anche consentito una grossolana valutazione del plasmidoma.

In *E. faecium* 24903-1C la sonda specifica per *optrA* ibridizzava sul cromosoma e su due plasmidi di dimensioni approssimativamente di 190 kb e 130 kb. Una reazione di ibridazione della sonda *poxA* era invece evidenziata sul cromosoma e su due plasmidi di circa 145 kb e 70 kb.

Per quanto riguarda *A. viridans* 1417-4A, la sonda specifica per il gene *optrA* produceva un segnale positivo su un plasmide di circa 70 kb (Fig. 16).



**Figura 36.** *S1-PFGE, southern blotting e ibridazione*

**A.** *S1-PFGE*

**B.** *Ibridazione con le sonde specifiche per poxA e oprA.*

*1, Mk Middle; 2, E. faecium 24903-1; 3, A. viridans 1417/4A; 4, controllo positivo poxA, 5, controllo negativo poxA; 6, Mk Low; 7, E. faecium 24903-1; 8, A. viridans 1417/4A; 9 controllo positivo oprA; 10, controllo negativo oprA*



## 4.DISCUSSIONE

Il fenomeno della resistenza agli antibiotici è un problema di primaria importanza a livello globale ancora lontano dall'essere risolto. Negli ultimi decenni, si è assistito all'emergere di resistenze in quasi tutti i generi batterici, con conseguenze drammatiche nel trattamento delle infezioni da essi sostenute. Il fenomeno ha avuto un impatto particolarmente grave in ambito ospedaliero, con problematiche importanti in ambito sanitario ma anche economico. L'OMS, l'Unione Europea e molti Ministeri Nazionali hanno messo in atto programmi di intervento, sorveglianze e campagne di sensibilizzazione per invitare ad un uso più razionale degli antibiotici. Del resto, il rallentamento cui si è assistito negli ultimi anni nella ricerca e nello sviluppo di nuove molecole ad attività antimicrobica impone la salvaguardia dei farmaci attualmente disponibili, in modo particolare di quelli considerati "last-resort" perché impiegati come ultima risorsa nel trattamento di infezioni altrimenti non curabili.

In un secolo che è stato segnato dall'allarmante emergenza di antibiotico-resistenze nei batteri Gram-negativi, la resistenza agli

oxazolidinoni rappresenta oggi la più grave minaccia tra i patogeni Gram-positivi. Il linezolid, primo membro di questa classe di farmaci, viene usato in ambito ospedaliero come “ultima risorsa” nel trattamento di gravi infezioni sostenute da batteri Gram-positivi multi-resistenti, inclusi MRSA, VRE, pneumococchi e micobatteri MDR.

La resistenza al LZD è stata segnalata poco dopo l'introduzione del farmaco sul mercato, tuttavia per alcuni anni il fenomeno si è manifestato in modo sporadico e sempre associato a mutazioni nell'rRNA 23S o nelle proteine ribosomiali.

In un secondo momento, tuttavia, sono emersi meccanismi di resistenza trasferibili, sia in ceppi umani che di origine animale. Questi determinanti di resistenza, spesso localizzati su elementi genetici mobili, conferiscono resistenza anche ad altre classi di antibiotici tra cui i fenicoli e, nel caso del gene *poxtA*, le tetraciline.

Fenicoli e tetraciline sono estesamente impiegati in ambito veterinario per prevenire o trattare infezioni batteriche. La pressione selettiva da essi esercitata ha inevitabilmente promosso la diffusione della linezolid-resistenza anche in ceppi di origine

animale. E' evidente che un serbatoio animale di geni di resistenza agli oxazolidinoni, potenzialmente trasmissibili a patogeni umani, ha un impatto molto grave sulla salute dell'uomo.

Gli enterococchi sono membri del microbiota intestinale dell'uomo e di molti animali. Questi microrganismi sono rilasciati in grandi quantità nell'ambiente con le feci e quindi possono essere trovati in diverse nicchie tra cui il suolo, gli alimenti di origine animale, i vegetali e l'acqua. L'impiego di enterococchi come indicatori fecali nel monitoraggio di routine della qualità dell'acqua è ormai consolidato e successivamente è stato esteso anche agli alimenti (Jay, 2005). Recentemente gli enterococchi sono stati anche stati proposti dalla "European Food Safety Authority" per il monitoraggio delle antibiotico-resistenze (European Food Safety Authority, 2008).

Sebbene considerati commensali, gli enterococchi sono la principale causa di infezione nosocomiale in tutto il mondo. Le resistenze acquisite in questo genere batterico stanno aumentando e limitano considerevolmente le opzioni terapeutiche. Gli oxazolidinoni sono tra i pochi antibiotici "last-resort" ancora

disponibili raccomandati per trattare infezioni gravi sostenute da VRE e da enterococchi MDR.

Lo scopo del lavoro è stato di verificare la presenza di geni di linezolid-resistenza in ambito veterinario e di valutare la possibilità che tali resistenze siano trasmesse dai serbatoi animali a patogeni umani. Dal momento che quasi tutte le sorveglianze animali, condotte soprattutto in Cina, sono state condotte nei suini si è deciso di concentrarsi su bovini e ovini.

Complessivamente sono stati raccolti ed analizzati 165 campioni fecali, 94 provenienti da ovini e 71 di origine bovina. Dopo un iniziale screening su Slanetz-Bartley supplementato con florfenicolo (10 mg/L), gli isolati florfenicolo-resistenti sono stati saggiati mediante PCR per la presenza di geni di resistenza al linezolid. Due ceppi, entrambi isolati da bovini, sono risultati positivi per la presenza di geni di linezolid-resistenza: 24903-1C aveva genotipo *optrA/poxA*, mentre l'isolato 1417-4A era positivo per il gene *optrA*. Sorprendentemente, mentre l'isolato 24903-1C era identificato come *E. faecium*, il 1417-4A risultava appartenere alla specie *A. viridans*. Questa è la prima segnalazione della presenza di geni di resistenza al linezolid in questa specie batterica.

Gli aerococchi sono cocci Gram-positivi che facilmente possono essere confusi con gli streptococchi alfa-emolitici (con i quali condividono la morfologia delle colonie), con gli stafilococchi (per l'aspetto microscopico) e con gli enterococchi (per i comuni tratti di antibiotico-resistenza). Solo l'introduzione della tecnologia MALDI-TOF ha reso possibile una loro rapida ed accurata identificazione. Gli aerococchi furono descritti per la prima volta nel 1953 come cocci Gram-positivi ambientali, catalasi- e ossidasi-negativi e fu identificata la prima specie: *A. viridans*. Nei 35 anni successivi alla loro scoperta, furono pubblicati solo scarsi dati su infezioni da aerococco nell'uomo, ma fu notato che aerococchi diversi da *A. viridans*, indicati come "Aerococcus-like organisms" (ALO), erano, seppur raramente, responsabili di infezioni urinarie e di endocardite acuta nell'uomo.

A lungo considerate non comune causa di infezione umana, oggi le specie ALO, e in particolare *Aerococcus urinae* e *Aerococcus sanguinicola*, sono riconosciute patogeni umani emergenti, responsabili di infezioni urinarie e di gravi forme invasive.

L'approccio terapeutico prevede una associazione di beta-lattamici, verso i quali mostrano bassi valori di MIC, e aminoglicosidi.

*A. viridans* è presente nell'ambiente ed è stato originariamente isolato dall'aria. L'habitat naturale degli aerococchi non è noto, tuttavia questi batteri sono presenti nella flora microbica intestinale dei polli e di altri animali ed è stato ipotizzato che possano risiedere anche nel microbiota intestinale umano (Rasmussen, 2013).

*A. viridans* è noto causare una grave infezione nelle aragoste, la gaffkaemia (Stewart *et al.*, 2004), ma può essere isolato anche dalle feci bovine, dal latte di bovini affetti da mastite subclinica (Devriese *et al.*, 1999) e da maiali con artrite. Questo aerococco può essere presente nella polvere, in acque salate, nel suolo, nelle salamoie per alimenti e persino in ambiente nosocomiale (Kerbaugh *et al.*, 1968). Verosimilmente *A. viridans* è parte del microbiota, dal momento che è in grado di produrre batteriocine, utili al batterio nella competizione con altre specie della normale flora (Ballester *et al.*, 1980). Inoltre, rispetto agli ALO, questo aerococco mostra valori di MIC di penicillina più elevati e sono state documentate resistenze acquisite ai beta-lattamici.

La presenza di *optrA* in una specie microbica in cui non erano mai stati segnalati determinanti di resistenza al linezolid è motivo di grave preoccupazione.

Significativo è anche l'isolamento di un ceppo di *E. faecium* portatore di due geni di resistenza agli oxazolidinoni: *optrA* e *poxxA*. In Italia, ad oggi, è stato descritto un solo isolato di *E. faecium poxxA*-positivo, isolato da feci suine.

In entrambi i ceppi da bovino, i geni dimostravano sempre una localizzazione plasmidica (nel caso di *E. faecium* anche cromosomica) con preoccupanti implicazioni riguardo alla loro trasferibilità. Anche se sperimentalmente non è stato possibile dimostrare il trasferimento della linezolid-resistenza da *A. viridans* allo streptococco ricevente, non si può escludere che ciò abbia luogo in natura e/o si verifichi con altre specie batteriche. Dagli esperimenti di ibridazione emerge, inoltre, che in *E. faecium* i geni risiedono su plasmidi di differenti dimensioni: ~190 e ~130 kb *optrA* e ~145 e ~70 kb *poxxA*. Questo dato suggerisce una mobilità intracellulare mediata da IS, fenomeno osservato anche in altri enterococchi linezolid-resistenti.

È ormai sempre più evidente che un efficace controllo delle antibiotico-resistenze non può prescindere da un approccio integrato che preveda un sinergismo tra gli interventi in campo veterinario e quelli in ambito medico. Lo studio del “resistoma” animale consente di monitorare la diffusione delle resistenze nei serbatoi non umani e di mettere a punto misure atte a prevenire e contenere la diffusione delle resistenze. E’ evidente che nel nostro Paese, oltre ad una maggiore sensibilizzazione ad un uso corretto degli antibiotici, sarà necessario attuare una sorveglianza estesa ai reservoir animali al fine di preservare l’efficacia di antibiotici last-resort come gli oxazolidinoni.



## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ *et al.* Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31:1791-1797.  
doi:10.1128/aac.31.11.1791
2. Shinabarger D and Eliopoulos GM. Resistance to linezolid. Tratto da: *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, edited by Mayed DL, *Humana Press*, 2009, 1: 247-258, ISBN: 978-1-60327-599-7
3. Park CH, Brittelli DR, Wang CLJ *et al.* Antibacterials. Synthesis and structure-activity studies of 3-aryl-2-oxooxazolidinones. 4. Multiply-substituted aryl derivatives. *J Med Chem.* 1992, 35, 1156.  
doi:10.1021/jm00084a022
4. Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK *et al.* Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program. *Clin Infect Dis.* 2003; 36:159-168.  
doi:10.1086/345744

5. Gemmell CG, on behalf of participating investigators in France, Germany, Holland, Spain, Italy, Sweden and the UK. Susceptibility of a variety of clinical isolates to linezolid: a European inter-country comparison, *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:47–52. doi:10.1093/jac/48.1.47
6. Poce G, Cocozza M, Consalvi S *et al.* SAR analysis of new anti-TB drugs currently in pre-clinical and clinical development. *Eur J Med Chem.* 2014; 86:335-351. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.066
7. Drusano GL, Myrick J, Maynard M *et al.* Linezolid Kills Acid-Phase and Nonreplicative-Persister-Phase *Mycobacterium tuberculosis* in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62:e00221-18. doi:10.1128/AAC.00221-18
8. Deshpande D, Srivastava S, Pasipanodya JG *et al.* Linezolid as treatment for pulmonary *Mycobacterium avium* disease. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:i24-i29. doi:10.1093/jac/dkx304
9. Zoller M, Maier B, Hornuss C *et al.* Variability of linezolid concentrations after standard dosing in critically ill patients: a prospective observational study. *Crit Care.* 2014; 18:R148. doi:10.1186/cc13984

10. Kishor K, Dhasmana N, Kamble SS *et al.* Linezolid Induced Adverse Drug Reactions - An Update. *Curr Drug Metab.* 2015; 16:553-559. doi:10.2174/1389200216666151001121004
11. Rival M, Chetioui A, Tailland M *et al.* Linezolid-induced status epilepticus. *Acta Neurol Belg.* 2020; 10.1007/s13760-020-01333-2. doi:10.1007/s13760-020-01333-2
12. Kanafani ZA, Corey GR. Tedizolid (TR-701): a new oxazolidinone with enhanced potency. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012; 21:515-522. doi:10.1517/13543784.2012.660250
13. Flanagan S, Fang E, Muñoz KA *et al.* Single- and multiple-dose pharmacokinetics and absolute bioavailability of tedizolid. *Pharmacotherapy.* 2014; 34:891-900. doi:10.1002/phar.1458
14. Kisgen JJ, Mansour H, Unger NR *et al.* Tedizolid: a new oxazolidinone antimicrobial. *Am J Health Syst Pharm.* 2014; 71:621-633. doi:10.2146/ajhp130482
15. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:603-612. doi:10.1128/AAC.05702-11

16. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC *et al.* The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:3251-3255
17. Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB *et al.* Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet.* 2001; 357:1179. doi:10.1016/S0140-6736(00)04376-2
18. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 358:207-208. doi:10.1016/S0140-6736(01)05410-1
19. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ *et al.* Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the *pneumococcus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3554-3557. doi: 10.1128/AAC.49.8.3554-3557.2005
20. Wilson DN, Schlunzen F, Harms JM *et al.* The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:13339-13344. doi:10.1073/pnas.0804276105
21. Miller K, Dunsmore CJ, Fishwick CW *et al.* Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the

peptidyl transferase center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1737-1742. doi:10.1128/AAC.01015-07

22. Hill RL, Kearns AM, Nash J *et al.* Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:442-445. doi:10.1093/jac/dkp494

23. Souli M, Sakka V, Galani I *et al.* Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33:137-142. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.08.017

24. Bøsling J, Poulsen SM, Vester B *et al.* Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein 13. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:2892-2896. doi:10.1128/aac.47.9.2892-2896.2003

25. Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ *et al.* Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:2329-2335. doi:10.1093/jac/dkq331

26. Billal DS, Feng J, Leprohon P *et al.* Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics*. 2011; 12, 512. doi.org/10.1186/1471-2164-12-512
27. Hölzel CS, Harms KS, Schwaiger K *et al.* Resistance to linezolid in a porcine *Clostridium perfringens* strain carrying a mutation in the *rplD* gene encoding the ribosomal protein L4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:1351-1353. doi:10.1128/AAC.01208-09
28. Lee SM, Huh HJ, Song DJ *et al.* Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible enterococci in Korea: low rate of 23S rRNA mutations in *Enterococcus faecium*. *J Med Microbiol*. 2017; 66:1730-1735. doi:10.1099/jmm.0.000637
29. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:2530-2533. doi:10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000
30. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.* The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:2500-2505. doi:10.1128/AAC.00131-06

31. Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG *et al.* Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:1097-1106. doi:10.1093/nar/29.5.1097
32. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L *et al.* A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 2005; 57:1064-1073. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x
33. Singh KV, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Tedizolid against Enterococci and Staphylococci, Including *cfr*<sup>+</sup> Strains, in a Mouse Peritonitis Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63:e02627-18. doi:10.1128/AAC.02627-18
34. He T, Wang Y, Schwarz S *et al.* Genetic environment of the multi-resistance gene *cfr* in methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* from chickens, ducks, and pigs in China. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304:257-261. doi:10.1016/j.ijmm.2013.10.005

35. Shen J, Wang Y, Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:1697-1706. doi:10.1093/jac/dkt092
36. Liu Y, Wang Y, Wu C, *et al.* First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:1650-1654. doi:10.1128/AAC.06091-11
37. Toh SM, Xiong L, Arias CA, *et al.* Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol.* 2007; 64:1506-1514. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05744.x
38. Marín M, Martín A, Alcalá L *et al.* *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59, 586–589. doi:10.1128/AAC.04082-14
39. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH *et al.* The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol.* 2013; 4:87. doi:10.3389/fmicb.2013.00087
40. Schwarz S, Wang Y. Nomenclature and functionality of the so-called *cfr* gene from *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:2476-2477. doi:10.1128/AAC.04893-14



41. Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP *et al.* Detection of a New *cfr*-Like Gene, *cfr(B)*, in *Enterococcus faecium* Isolates Recovered from Human Specimens in the United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:6256-6261. doi:10.1128/AAC.01473-15
42. Bender JK, Fleige C, Klare I *et al.* Detection of a *cfr(B)* Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. *PLoS One.* 2016; 11:e0167042. doi:10.1371/journal.pone.0167042 .
43. Liu Y, Wang Y, Schwarz S *et al.* Investigation of a multiresistance gene *cfr* that fails to mediate resistance to phenicols and oxazolidinones in *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:892-898. doi:10.1093/jac/dkt459
44. Tang Y, Dai L, Sahin O *et al.* Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr(C)* in foodborne pathogen *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 1581–1588. doi:10.1093/jac/dkx023
45. Candela T, Marvaud JC, Nguyen TK *et al.* A *cfr*-like gene *cfr(C)* conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50:496-500. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.013

46. Stojković V, Ulate MF, Hidalgo-Villeda F *et al.* *cfrB*, *cfrC*, and a potential new *cfr-like* gene in *Clostridium difficile* strains recovered across Latin America. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 64:e01074-19. doi:10.1128/AAC.01074-19
47. Wang Y, Lv Y, Cai J *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70:2182-90. doi:10.1093/jac/dkv116
48. Davidson AL, Dassa E, Orelle C *et al.* Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72:317-364. doi:10.1128/MMBR.00031-07
49. Goffeau A, De Hertogh B. ABC Transporters. Tratto da: Encyclopedia of Biological Chemistry, *Academic Press*, 2013, 7-17, ISBN: 9780123786319
50. Sharkey LK, Edwards TA, O'Neill AJ. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *mBio.* 2016; 7:e01975. doi:10.1128/mBio.01975-15
51. He T, Shen Y, Schwarz S *et al.* Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates

of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:1466–73.  
doi:10.1093/jac/dkw016

52. Darini AL, Palepou MF, Woodford N. Effects of the movement of insertion sequences on the structure of *VanA* glycopeptide resistance elements in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1362-1364.  
doi:10.1128/aac.44.5.1362-1364.2000.

53. Chen H, Wang X, Yin Y *et al.* Molecular characteristics of oxazolidinone resistance in enterococci from a multicenter study in China. *BMC Microbiol.* 2019; 19:162. doi:10.1186/s12866-019-1537-0

54. Kehrenberg C, Schwarz S. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:813–5. doi:10.1128/AAC.49.2.813-815.

55. Li D, Li XY, Schwarz S *et al.* Tn6674, a Novel Enterococcal *optrA*-Carrying Multiresistance Transposon of the Tn554 Family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; doi:10.1128/AAC.00809-19

56. Fan R, Li D, Wang Y *et al.* Presence of the *optrA* Gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus sciuri* of Porcine Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:7200-7205. doi:10.1128/AAC.01591-16

57. Huang J, Chen L, Wu Z *et al.* Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of *optrA* in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 614–6. doi: 10.1128/JCM.00535-13
58. Mendes RE, Deshpande L, Streit JM *et al.* ZAAPS programme results for 2016: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:1880-1887. doi:10.1093/jac/dky099
59. Liu D, Yang D, Liu X *et al.* Detection of the enterococcal oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Campylobacter coli*. *Vet Microbiol.* 2020; 246:108731. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108731
60. Cui L, Wang Y, Lv Y *et al.* Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene *optrA* in *Enterococcus* Isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:7490-7493. doi:10.1128/AAC.01256-16
61. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C *et al.* Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:1118-1119. doi:10.1093/jac/dkv438

62. Morroni G, Brenciani A, Simoni S *et al.* Commentary: Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene *optrA* in *Enterococcus* Isolates in China from 2004 to 2014. *Front Microbiol.* 2017; 8:1631. doi:10.3389/fmicb.2017.01631
63. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM *et al.* Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:3252-3257. doi:10.1093/jac/dkx292
64. Li D, Wang Y, Schwarz S *et al.* Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*, *J Antimicrobl Chemother.* 2016, 1474–1478. doi:10.1093/jac/dkw040
65. Di Sante L, Morroni G, Brenciani A *et al.* pHT $\beta$ -promoted mobilization of non-conjugative resistance plasmids from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis*, *J Antimicrob Chemother.* 2017; 2447–2453, doi:10.1093/jac/dkx197
66. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A *et al.* Characterization of *poxxA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of

clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:1763-1769.  
doi:10.1093/jac/dky088

67. D'Andrea MM, Antonelli A, Brenciani A *et al.* Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying *poxA*, *cfr* and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:2870-2875. doi:10.1093/jac/dkz278

68. Egan SA, Shore AC, O'Connell B *et al.* Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75:1704-1711.  
doi:10.1093/jac/dkaa075

69. Papagiannitsis CC, Tsilipounidaki K, Malli E *et al.* Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxA*. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:2461-2462.  
doi:10.1093/jac/dkz155

70. Brenciani A, Fioriti S, Morroni G *et al.* Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxA*. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74: 817-18

71. Lei CW, Kang ZZ, Wu SK *et al.* Detection of the phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of food-producing animal origin in China. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:2459-2461. doi:10.1093/jac/dkz198
72. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS *et al.* Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:2865-2869. doi:10.1093/jac/dkz263
73. Hao W, Shan X, Li D *et al.* Analysis of a *poxA* and *optrA* co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74:1771-1775. doi:10.1093/jac/dkz109
74. Jay JM. Indicators of food microbial quality and safety. Tratto da: Modern food microbiology 7th, *Springer Science and Business Media*, 2005, 473–95, ISBN: 978-1-4615-7476-7
75. European Food Safety Authority (EFSA). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA journal.* 2008; 141:1–44

76. Rasmussen M. Aerococci and aerococcal infections. *J Infect.* 2013; 66:467-474. doi:10.1016/j.jinf.2012.12.006
77. Stewart JE, Cornick JW, Zwicker BM *et al.* Studies on the virulence of *Aerococcus viridans* (*var.*) *homari*, the causative agent of gaffkemia, a fatal disease of homarid lobsters. *Dis Aquat Organ.* 2004; 60:149-155. doi:10.3354/dao060149
78. Devriese LA, Homme J, Laevens H *et al.* Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol.* 1999; 70:87-94. doi:10.1016/s0378-1135(99)00124-8
79. Kerbaugh MA, Evans JB. *Aerococcus viridans* in the hospital environment. *Appl Microbiol.* 1968; 16:519-523.
80. Ballester JM, Ballester M, Belaich JP. Purification of the viridicin produced by *Aerococcus viridans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980; 17:784-788. doi:10.1128/aac.17.5.784



## 6. SITOGRAFIA

1. WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)

2. Jim O'Neill, Wellcome Trust and UK Government. Review on

Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. December 2014: [https://amr-](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

[review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

[%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

3. Ministero della Salute, Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020:

[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2660\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf)

4. Ministero della Salute, L'Uso degli Antibiotici in Italia - Rapporto Nazionale Anno 2018:

[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2894\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2894_allegato.pdf)

5. WHO, WHO Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals, 2017:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf?sequence=1ANIMALS>

6. FDA, SIVEXTRO safely and effectively, 2019:

[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/205436s0051b1.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/205436s0051b1.pdf)