



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

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA
Curriculum Tecnologie Biologiche

STUDIO DELLA PRESENZA DI GENI DI RESISTENZA AGLI
OXAZOLIDINONI IN ENTEROCOCCHI DI ORIGINE SUINA

DETECTION OF OXAZOLIDINONE RESISTANCE GENES IN
ENTEROCOCCI OF SWINE ORIGIN

Tesi di Laurea Magistrale di:

Marzia Cinthi

Relatore Chiar.ma Prof.ssa:

Eleonora Giovanetti

Sessione Straordinaria (febbraio)

Anno Accademico 2018/2019

*Ai miei genitori
che mi hanno permesso di essere
ciò che sono*

Sommario

1.INTRODUZIONE	1
1.1 Oxazolidinoni	6
1.1.1 Linezolid	7
1.1.2 Tedizolid	9
1.1.3 Meccanismo d'azione degli Oxazolidinoni	10
1.2 Meccanismi di resistenza	12
1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S	12
1.2.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3 e L4.....	14
1.2.3 Il gene <i>cfr</i>	18
1.2.4 Il gene <i>cfr</i> (B)	21
1.2.5 Il gene <i>cfr</i> (C).....	22
1.2.6 Il gene <i>optrA</i>	23
1.2.7 Co-localizzazione plasmidica di <i>cfr</i> e <i>optrA</i>	26
1.2.8 Il gene <i>poxTA</i>	29
2. MATERIALI E METODI	33
2.1 Campionamento ed isolamento di enterococchi florfenicolo- resistenti da campioni fecali.....	33

2.2 Antibiotici e test di sensibilità.....	35
2.3 Estrazione del DNA totale	37
2.4 Caratterizzazione genotipica degli enterococchi florfenicolo- resistenti	39
2.5 Tipizzazione	40
2.5.1 SmaI-PFGE	40
2.6 Saggi di trasferibilità.....	42
2.6.1 Coniugazione su filtro	42
2.7 S1-PFGE	44
2.8 Southern blotting e ibridazione.....	44
3. RISULTATI.....	46
3.1 Ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti, saggi di PCR e test di sensibilità	46
3.2 Tipizzazione degli isolati mediante SmaI-PFGE	50
3.3 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni	52
3.4 Localizzazione genica	57
4. DISCUSSIONE	60
5. BIBLIOGRAFIA	69

1.INTRODUZIONE

Sin dalla loro scoperta, gli antimicrobici hanno giocato un ruolo chiave nel controllo di numerose malattie infettive e contribuito a migliorare significativamente lo stato di salute degli esseri umani e degli animali. Tale miglioramento rischia oggi di essere compromesso dalla crescente diffusione di antibiotico-resistenze tra i più rilevanti patogeni umani. Nel secondo dopoguerra, il sempre più diffuso impiego di antibiotici ha ridotto drasticamente la mortalità associata ad infezioni fino ad allora non trattabili; ciò ha indotto a ritenere che il problema delle malattie infettive fosse definitivamente risolto. In realtà, già immediatamente dopo l'immissione nel mercato dei primi farmaci, sono stati segnalati ceppi antibiotico-resistenti; questo fenomeno, soprattutto negli ultimi decenni, si è rapidamente esteso ed oggi la diffusione delle resistenze rappresenta un serio problema a livello globale che interessa sia i paesi industrializzati che quelli in via di sviluppo. Il problema delle antibiotico-resistenze è complesso poiché riconosce diverse cause: (a) eccessivo e/o inappropriato uso di antimicrobici, sia in medicina umana che veterinaria; (b) impiego di antibiotici in zootecnia e in agricoltura; (c) diffusione di ceppi multi-resistenti (MDR) in ambito nosocomiale;

(d) diffusione o acquisizione di ceppi resistenti in occasione di viaggi internazionali, oggi sempre più frequenti, e a causa dei flussi migratori. Tutto ciò ha un impatto negativo sulla qualità della vita ed è motivo di grave preoccupazione da un punto di vista clinico, sociale ed economico.

Gli alimenti, in particolare quelli di origine animale, sono un importante veicolo di trasmissione di microrganismi all'uomo. Negli allevamenti, infatti, gli antibiotici vengono impiegati massivamente nel trattamento e nella prevenzione delle infezioni animali. Gran parte di questi farmaci non viene in realtà assorbita a livello intestinale, ma è rilasciata nell'ambiente attraverso le feci. Antibiotici e microrganismi con meccanismi di resistenza trasferibili si accumulano nel suolo (ad esempio in seguito a concimazione con letame), e la pressione selettiva operata dai farmaci inevitabilmente promuove il trasferimento di geni di antibiotico-resistenza ai microrganismi ambientali.

Il florfenicolo, analogo fluorurato sintetico del tiamfenicolo, è un antibiotico ad ampio spettro utilizzato in medicina veterinaria nel trattamento di infezioni del tratto respiratorio e gastrointestinale degli animali da allevamento.

Numerosi studi dimostrano che un impiego non razionale di tale antibiotico favorisce la selezione di batteri resistenti (Zhao *et al.*, 2016) e che la diffusione di geni di resistenza dai ceppi animali a quelli umani è purtroppo un evento probabile attraverso le carcasse degli animali, gli impianti di ventilazione

degli allevamenti, i sistemi per la gestione rifiuti o attraverso gli stessi lavoratori degli allevamenti. È ormai evidente quindi che il controllo del fenomeno “antibiotico-resistenza” non può prescindere da un approccio integrato che preveda interventi coordinati in campo veterinario, ambientale e medico.

In ambito umano una strategia in grado di contenere la diffusione delle resistenze, non può prescindere da un uso prudente degli antibiotici e dall’attuazione di pratiche di controllo delle infezioni tramite screening e isolamento dei microrganismi che circolano in ambito nosocomiale.

In un secolo segnato dalla preoccupante emergenza di antibiotico-resistenze nei batteri Gram-negativi, la resistenza agli oxazolidinoni rappresenta oggi probabilmente 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 MDR, inclusi *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), pneumococchi e micobatteri MDR.

Gli enterococchi, normali commensali dell’intestino sia umano che animale, sono riconosciuti importanti patogeni opportunisti soprattutto in ambito

nosocomiale: *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* risultano tra i più frequenti (terzo e quarto posto) patogeni ospedalieri a livello globale.

In *Enterococcus* spp., resistenze acquisite a penicillina/ampicillina, aminoglicosidi e glicopeptidi, sono riportate in numero crescente in tutto il mondo limitando considerevolmente le opzioni terapeutiche. Le alternative nel trattamento delle infezioni sostenute da enterococchi MDR e vancomicina-resistenti sono limitate agli antibiotici di ultima risorsa (quinupristin/dalfopristin, linezolid, tigeciclina, daptomicina) [Bender, Drug Resist Update, 2018] approvati solo per alcune indicazioni e nei confronti dei quali sono già state segnalate resistenze.

Gli enterococchi, in considerazione del loro habitat preferenziale, della loro ampia diffusione, e della facilità di coltivazione, sono usati come indicatori di inquinamento fecale di acque dolci e di balneazione, ma anche come microrganismi chiave nei sistemi di sorveglianza sia veterinaria che umana.

Inoltre, gli enterococchi hanno una particolare propensione ad acquisire, conservare e disseminare informazioni genetiche, inclusi i determinanti di antibiotico-resistenza, a membri del genere *Enterococcus* così come a batteri Gram-positivi correlati. La diffusione degli enterococchi in numerosi habitat naturali e la loro flessibilità nel rispondere alle diverse condizioni ambientali

fanno di questo genere batterico un “central hub” nella diffusione di geni di resistenza tra batteri Gram-positivi (Werner, 2013).

La presenza di un serbatoio animale di geni di resistenza agli oxazolidinoni, potenzialmente trasmissibili a patogeni umani, avrebbe un impatto molto preoccupante sulla salute umana.

Le prime resistenze al linezolid, segnalate sporadicamente già poco dopo l'introduzione del farmaco sul mercato, risultavano associate a mutazioni.

Solo in un secondo momento sono emersi, in ceppi di origine sia animale che umana, meccanismi di resistenza trasferibili perché codificati da geni localizzati su elementi genetici mobili.

Negli ultimi decenni, al grave fenomeno legato alla insorgenza e diffusione delle antibiotico-resistenze, si è associato lo scarso interesse delle industrie farmaceutiche per lo sviluppo di nuovi antibiotici: tutto ciò impone di preservare le risorse terapeutiche ancora disponibili analizzando il ruolo cruciale di alcuni serbatoi animali nell'emergere delle resistenze nei patogeni umani.

1.1 Oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni sono una classe di antibiotici caratterizzata dalla presenza di un composto organico eterociclico derivante dall'ossidazione in posizione 2 di un anello ossazolidinico: il 2-ossazolidinone. Inizialmente, la tossicità rilevata negli animali ne rese impossibile l'impiego nell'uomo; solo in un secondo momento la Upjohn (oggi Pharmacia e Upjohn) sviluppò due derivati: eperezolid e linezolid.

Anche se in fase preclinica entrambi i composti dimostrarono solubilità, potere antimicrobico e spettro d'azione pressoché sovrapponibili, solo il linezolid, grazie a migliori caratteristiche farmacocinetiche, raggiunse la fase clinica II (Shaw & Barbachyn, 2011) e nel 2000 venne approvato per uso clinico dalla Food and Drug Administration (FDA). Nel 2014 un oxazolidinone di seconda generazione (tedizolid) è stato approvato per il trattamento di gravi infezioni della cute e dei tessuti molli sostenute da Gram-positivi (Zhanel *et al.*, 2015).

1.1.1 Linezolid

Il linezolid, commercializzato con il nome di Zyvox®, è stato il primo oxazolidinone ad essere approvato dalla FDA (Shaw & Barbachyn, 2011). Lo spettro d'azione, sostanzialmente limitato ai Gram-positivi, include anche cocci resistenti a penicillina, cefalosporine, oxacillina e vancomicina.

Il linezolid si lega al “Peptidyl Transferase Center” (PTC) della subunità ribosomiale 50S (rRNA 23S), quasi all'interfaccia con la subunità 30S e in prossimità dei siti di legame di cloramfenicolo, lincomicina e altri antibiotici attivi sul ribosoma. Il legame del linezolid produce un blocco dell'elongazione della catena peptidica e della formazione del complesso tRNA^{fMet}-mRNA-70S. Il gruppo N-aril-oxazolidinone è essenziale per l'attività del farmaco, così come la configurazione sterica del C-5 e il gruppo C-5 acil-amino-metilico dell'anello A (Figura 1).

Il sostituente fluoro-aromatico e il gruppo morfolinico in posizione para, sono responsabili rispettivamente di una maggiore disponibilità del farmaco e della farmacocinetica più favorevole; entrambi i sostituenti contribuiscono ad incrementare l'idrosolubilità e a ridurre la tossicità.

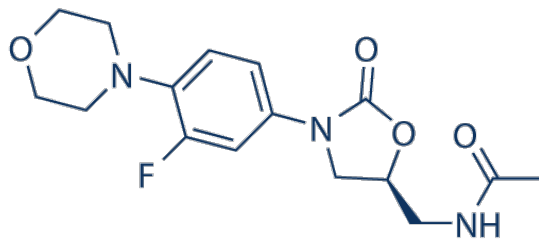


FIGURA 1. Struttura chimica del linezolid. Tratto da Hashemian *et al.*

L'antibiotico viene impiegato nel trattamento di: (i) polmoniti nosocomiali da *S. aureus* (incluso MRSA) e da *S. pneumoniae*; (ii) infezioni sostenute da *E. faecium* meticillino-resistente; (iii) infezioni acute della pelle da *S. aureus* (SSSI); (iv) polmoniti comunitarie da *S. pneumoniae*; (v) meningiti da *S. pneumoniae* penicillino-resistente. Il linezolid può essere somministrato per via parenterale o per via orale e non sono state evidenziate interazioni negative da concomitante assunzione di cibo o dalla co-somministrazione di antiacidi come gli idrossidi di magnesio e di alluminio (Hashemian *et al.*, 2018). La valutazione in vitro della sua attività antibatterica, indica valori di MIC₅₀ di 2-4 mg/L negli stafilococchi, 2-4 mg/L negli enterococchi e 1-2 mg/L negli streptococchi. Piccole variazioni nella determinazione ed interpretazione dell'endpoint possono essere imputate rispettivamente alla

metodica utilizzata (microdiluizione in brodo e in agar, ed E-test), e alle linee guida prese come riferimento (EUCAST o CSLI) (Mendes *et al.*, 2014).

1.1.2 Tedizolid

Il tedizolid, commercialmente noto con il nome di Sivextro[®], è stato un oxazolidinone di seconda generazione approvato per uso clinico nel 2014 dalla FDA. Rispetto al linezolid, il tedizolid è caratterizzato da una diversa catena laterale in posizione C5 responsabile della sua attività anche nei confronti di ceppi linezolid-resistenti; inoltre l'aggiunta di un anello D e la presenza di un gruppo metilico che sostituisce quello acil-amino-metilico in C5 dell'anello A, stabilizzano il legame del farmaco al sito bersaglio (Figura 2).

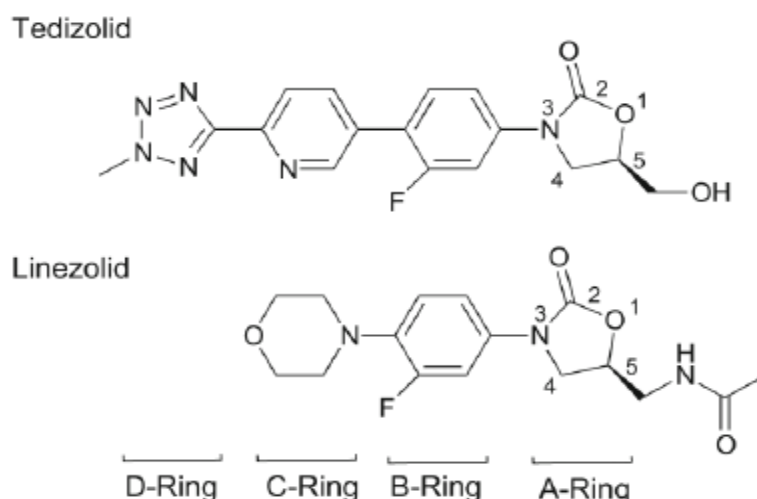


FIGURA 2. Struttura chimica di tedizolid e linezolid a confronto. Tratto da Zhanel *et al.*

In vivo, il tedizolid risulta essere dalle quattro alle otto volte più attivo del linezolid nei confronti di stafilococchi (incluso MRSA), enterococchi (incluso VRE) e streptococchi, anche di fenotipo linezolid-resistente (Zhanel *et al.*, 2015). La posologia del tedizolid prevede una dose giornaliera di 200 mg per 6-10 giorni, mentre il linezolid viene somministrato attraverso compresse da 600 mg assunte ogni 12 ore.

1.1.3 Meccanismo d'azione degli Oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni inibiscono la sintesi proteica legando il PTC sul ribosoma. Le prime indicazioni sull'esatta localizzazione del sito di legame del linezolid si ebbero nel 1999 grazie a studi sulla localizzazione del PTC e su mutazioni nell'rRNA 23S (Kloss *et al.*, 1999). Questi primi risultati furono confermati da successivi studi cristallografici condotti sull'archea *Haloarcula marismortui* che, possedendo un'unica copia genica per l'rRNA 23S, consentì di superare l'ostacolo rappresentato dalla ridondanza degli operoni per gli rRNA, e su *Deinococcus radiodurans* (Long & Vester, 2012). Il PTC è localizzato all'interno della subunità ribosomiale 50S, nella parte inferiore

della fessura in cui si posizionano l'estremità 3' dell'amminoacil-tRNA e il peptidil-tRNA per la sintesi proteica (Figura 3A). Il linezolid lega il ribosoma impedendo il preciso posizionamento del tRNA nel sito A nel PTC.

Lo stesso studio mette in evidenza che il linezolid ha un sito di legame condiviso da altri antibiotici e che i nucleotidi del PTC promuovono il legame con l'antibiotico tramite piccoli cambiamenti nella loro posizione; in particolare il nucleotide U2585, molto conservato, ha la funzione di coordinare il corretto posizionamento del tRNA nel sito P (FIGURA 3B).

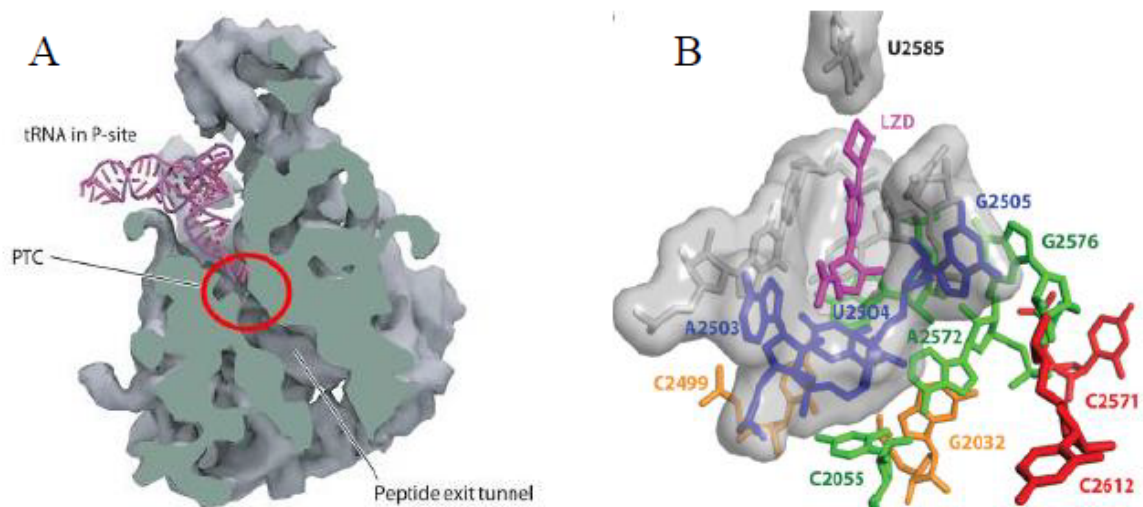


FIGURA 3. (A) Sezione sagittale della subunità maggiore del ribosoma batterico con il PTC evidenziato dal cerchio rosso; in viola, il tRNA legato al sito P. Tratto da Long & Vester. (B) Visione ingrandita del sito di legame del linezolid, ottenuta con il software Pymol. Vengono mostrati, con differenti colori, i nucleotidi interessati nel legame con il linezolid. I nucleotidi più prossimi al linezolid (A2503, U2504, G2505) sono rappresentati in blu. Quelli più lontani in verde, arancio e rosso. Tratto da Long & Vester.

1.2 Meccanismi di resistenza

I primi fenomeni di resistenza agli oxazolidinoni si manifestarono, seppur in modo sporadico, già dopo un anno dall'approvazione del linezolid da parte della FDA. I principali meccanismi di resistenza noti sono riconducibili alla comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22, e all'acquisizione di determinanti di resistenza trasferibili.

1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S

L'insorgenza di mutazioni a livello dell'rRNA 23S, responsabili della resistenza al linezolid, in realtà furono messe in evidenza ancora prima dell'approvazione dell'antibiotico da parte della FDA (Mendes *et al.*, 2014). Subito dopo il lancio del linezolid (aprile 2000) furono descritti enterococchi e stafilococchi resistenti (Shaw & Barbachyn, 2011).

Il sito di legame del linezolid nel dominio V dell'rRNA 23S a livello del PTC è caratterizzato dalla presenza di alcuni nucleotidi altamente conservati [G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585 (numerazione riferita a *Escherichia coli*)] in grado di interagire direttamente con il linezolid (Figura 4).

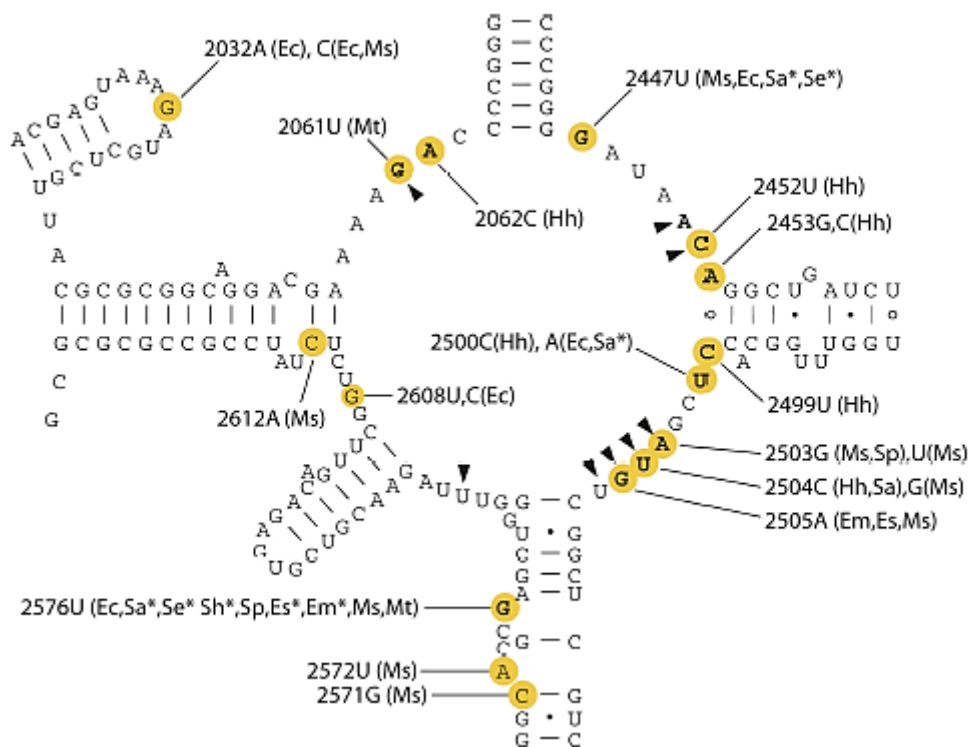


FIGURA 4. Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA 23S (sequenza di *Mycobacterium smegmatis* e numerazione di *E. coli*). I triangoli neri indicano i nucleotidi che interagiscono con il linezolid. I cerchi gialli evidenziano i nucleotidi che vanno incontro a mutazione; quelli in grassetto rappresentano le mutazioni che conferiscono un incremento significativo della MIC di linezolid (>4 volte). Le mutazioni e gli organismi corrispondenti sono indicate con due lettere: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*Staphylococcus epidermidis*), Sh (*Staphylococcus haemolyticus*), Sp (*Streptococcus pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*M. smegmatis*), Mt (*Mycobacterium tuberculosis*), Hh (*Halobacterium halobium*). Gli asterischi indicano mutazioni descritte in ceppi di isolamento clinico. Tratto da Long & Vester.

Ceppi linezolid-resistenti hanno mostrato mutazioni a carico sia dei nucleotidi che interagiscono direttamente con l'antibiotico (G2061, A2503, U2504 e G2505), che a livello di nucleotidi più lontani (A2062, G2447, A2453,

C2499, U2500 e G2576) (Long & Vester, 2012). La resistenza non è quindi conferita esclusivamente da mutazioni in nucleotidi prossimi al sito di legame del linezolid, ma anche da mutazioni che coinvolgono nucleotidi che non interagiscono direttamente con il linezolid (G2576U e G2447U) (Long & Vester, 2012).

La mutazione in G2576U, frequentemente descritta sia negli enterococchi che negli stafilococchi, conferisce un livello di resistenza evidentemente correlato con il numero di operoni interessati dalla mutazione (Long & Vester, 2012).

In *E. faecalis* e in *E. faecium*, che possiedono rispettivamente quattro e sei alleli rDNA 23S nel genoma, il grado di resistenza degli isolati è correlato al rapporto tra alleli mutati e wild-type. In Cina, ceppi linezolid-resistenti di *E. faecalis* e *Enterococcus gallinarum* isolati da suini (MIC, 8-16 mg/L) hanno mostrato una mutazione G2576T sull'rRNA 23S (Torres *et al.*, 2018).

1.2.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3 e L4

In aggiunta alle mutazioni sull'rRNA 23S, anche le proteine ribosomiali L3 e L4 possono andare incontro a mutazione. Una porzione importante della proteina ribosomiale L3 si posiziona sulla superficie della subunità 50S fino ad arrivare, tramite una struttura a loop, all'interno del PTC. Anche parte della proteina L4 è localizzata in prossimità del PTC ma nel tunnel attraverso

il quale i peptidi nascenti escono dal ribosoma (Figura 5). Il contributo alla resistenza delle mutazioni della proteina L4 è ancora oggetto di studio (Long & Vester, 2012); la maggior parte delle mutazioni identificate si riscontra nella proteina L3 probabilmente per una sua maggiore vicinanza al PTC. Mutazioni a livello della proteina L3 erano già note causare resistenza alle pleuromutiline, antibiotici che condividono lo stesso sito bersaglio del linezolid. In realtà, il fatto che mutazioni in L3 e L4 potessero essere indotte in vitro dal linezolid, ha consentito di ipotizzare che esse potessero rappresentare un meccanismo di resistenza al farmaco (Mendes *et al.*, 2014). In effetti, mutazioni in L3 e L4 in grado di determinare una ridotta sensibilità al linezolid sono state riportate in numerosi isolati, sia da sole che in associazione con altri meccanismi di resistenza (Tabella 1) (Long & Vester, 2012).

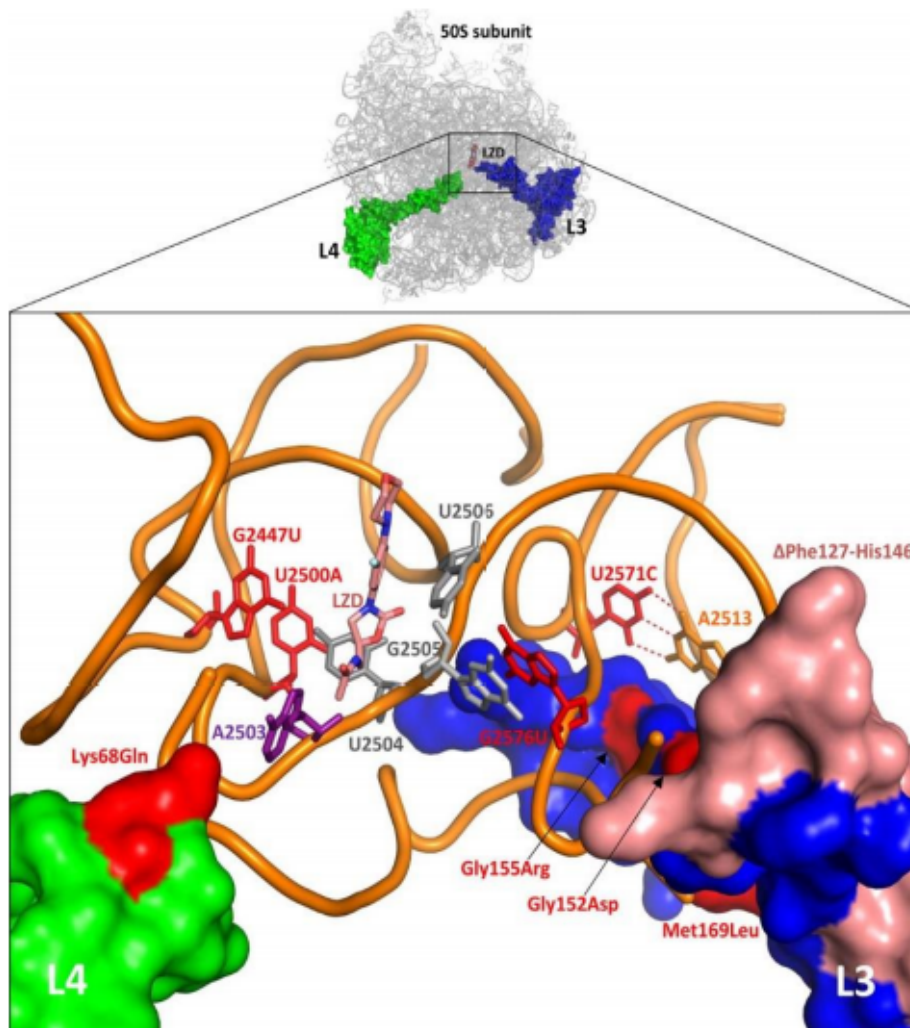


FIGURA 5. Rappresentazione del sito di legame del linezolid nel PTC: la proteina L3 è indicata in blu, la proteina L4 in verde. Oltre ad alcune mutazioni nell'rRNA 23S sono indicate anche le mutazioni aminoacidiche in L3 e L4 responsabili della resistenza al linezolid. Tratto da Locke *et al.*

Mutation	Organism	D. radiodurans L3 ^a	LZD distance ^b	Remarks ^c
L3				
ΔF1 27-H146	<i>S. aureus</i>	T113-K132		
G139R	<i>S. aureus</i>	G125	>25	C, T, 2576T
ΔS145	<i>S. aureus</i>	S131	>25	C
ΔS145/H146Y	<i>S. aureus</i>	S131/K132	>25/19.3	C, cfr
H 146R/M156T	<i>Staphylococcus</i>	K132/G143	19.3/15.2	C, T, 2215A, 2576T, --, ^d L4-ins70G
H146Q/V154L/A157R	<i>Staphylococcus</i>	K132/I141/R144	19.3/22.1/7.0	C, T, --, ^d L4-ins70G, -- ^e
F147I	<i>Staphylococcus</i>	K133 or W134	22.4 or >25	C, T, 2215A, 2576T, --, ^d L4-ins70G
F147I/A157R	<i>S. epidermidis</i>	K133 or W134/R144	22.4 or >25/7.0	C, --, ^d --, ^e L4-K68R/ ^e
G152D	<i>S. aureus</i>	G139	20.4	2447T
G152D	<i>S. aureus</i>	G139	20.4	C, T
G155R	<i>S. aureus</i>	G142	17.5	
G155R/M169L	<i>S. aureus</i>	G142/M156	17.5/>25	
A157R	<i>S. epidermidis</i>	R144	7.0	C, 2447T
S158F/D159Y	<i>S. epidermidis</i>	K145/T146	13.3/5.4	C, cfr, L3-L101V
S158Y/D159Y	<i>S. cohnii</i>	K145/T146	13.3/5.4	C, cfr, L4-N20S/A133T/V155I
ΔM169-G174	<i>S. aureus</i>	DM156-G161		C, cfr
L4				
N20S/A133T/V155I	<i>S. cohnii</i>			C, cfr, L3-S158F/D159Y
ΔW65-R66	<i>S. pneumoniae</i>	Y59-G60	24.2-21.6	
ΔW65-R66	<i>S. pneumoniae</i>	Y59-G60	24.2-21.6	C, RE
ΔK68-G69	<i>S. pneumoniae</i>	K62-Q63	11.2-15.1	C, RE
K68N	<i>S. epidermidis</i>	K62	11.2	2576T
K68Q	<i>S. aureus</i>	K62	11.2	
G71D	<i>C. perfringens</i>	G65	15.6	
ins71GGR72	<i>S. epidermidis</i>	G65/N66	15.6/16.1	2576T
L108S/ins71GGR72	<i>S. epidermidis</i>	L102	>75	2534T, -- ^e

Tabella 1. Mutazioni in L3 e L4 associate alla linezolid-resistenza negli stafilococchi e in un isolato di *Clostridium perfringens*. Tratto da Long & Vester.

^a La sequenza di L3 di *Deinococcus radiodurans* è stata utilizzata per determinare le distanze degli aminoacidi mutati del sito di legame del linezolid.

^b La distanza indicata tra linezolid e i corrispondenti aminoacidi di *D. radiodurans* è la più piccola.

^c Informazioni aggiuntive: C isolato clinico, T trattamento con linezolid, cfr presenza del gene *cfr*, RE evidenza di resistenza.

^d L3-L101V, che non influenza la resistenza al linezolid.

^e L4N158S, che non influenza la resistenza al linezolid.

^f Nessun dato disponibile sugli allineamenti.

1.2.3 Il gene *cfr*

Il gene *cfr* (cloramphenicol and florfenicol resistance) è il primo gene di resistenza trasferibile al linezolid descritto nel 1997 in un ceppo di *Staphylococcus sciuri* di origine animale. Successivi studi dimostrarono che *cfr* era localizzato su plasmide di 17,1 kb (pSCFS1) e che era in grado di conferire resistenza a cloramfenicolo e florfenicolo. Solo in un secondo momento è stato chiarito il suo meccanismo d'azione: *cfr* codifica una metiltransferasi che aggiunge un gruppo metile al C8 del nucleotide A2503 dell'rRNA 23S (Kehremberg *et al.*, 2005) (FIGURA 6). Il gene conferisce resistenza a cinque differenti classi di antibiotici: fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A (fenotipo PhLOPSA), che si legano in siti contigui ma non identici nel PTC; *cfr* è inoltre responsabile di una ridotta sensibilità ai macrolidi a 16 atomi di carbonio (Long *et al.*, 2006). Ad oggi, il gene è stato indentificato sia in generi Gram-positivi (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) che Gram-negativi (*Proteus* ed *Escherichia*) (Shen *et al.*, 2013 e Wang *et al.*, 2013). *cfr* è quasi sempre fiancheggiato da IS (sequenze di inserzione), più comunemente da IS256, IS21-558, ISEnfa4 e

IS1216, che mediano gli eventi di ricombinazione che promuovono la sua diffusione (Shen *et al.*, 2013).

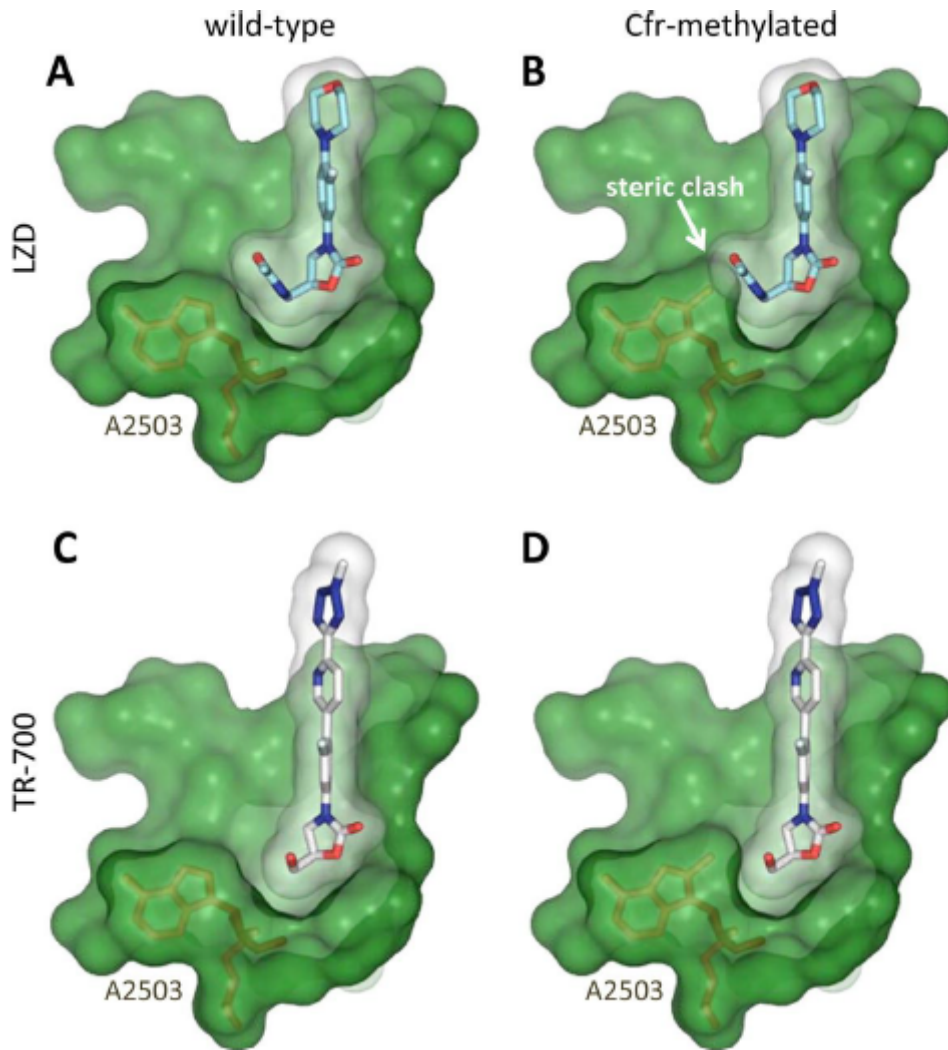


FIGURA 6. Analisi strutturale del legame degli oxazolidinoni in presenza della metilazione indotta da *cfr*. **(A)** Struttura cristallizzata del legame del linezolid alla subunità 50S di *H. marismortui*; **(B)** Modello di legame del linezolid in presenza della metilazione di A2503. **(C e D)** Modelli di legame del tedizolid (denominato inizialmente TR700) sul ribosoma wild type e sul ribosoma metilato da *cfr*. Tratto da Locke *et al.*

Negli enterococchi, la presenza di *cfr* a localizzazione plasmidica è stata riportata nel 2010 in un ceppo di *E. faecalis* di origine animale (EF-01); la proteina Cfr differiva dal *wild type* di *S. sciuri* per due amminoacidi (Liu *et al.*, 2011). Da allora, sono stati descritti solo pochi enterococchi *cfr*-positivi, i contesti genetici tuttavia, mostravano delle differenze con il plasmide pEF-01 (Figura 7).

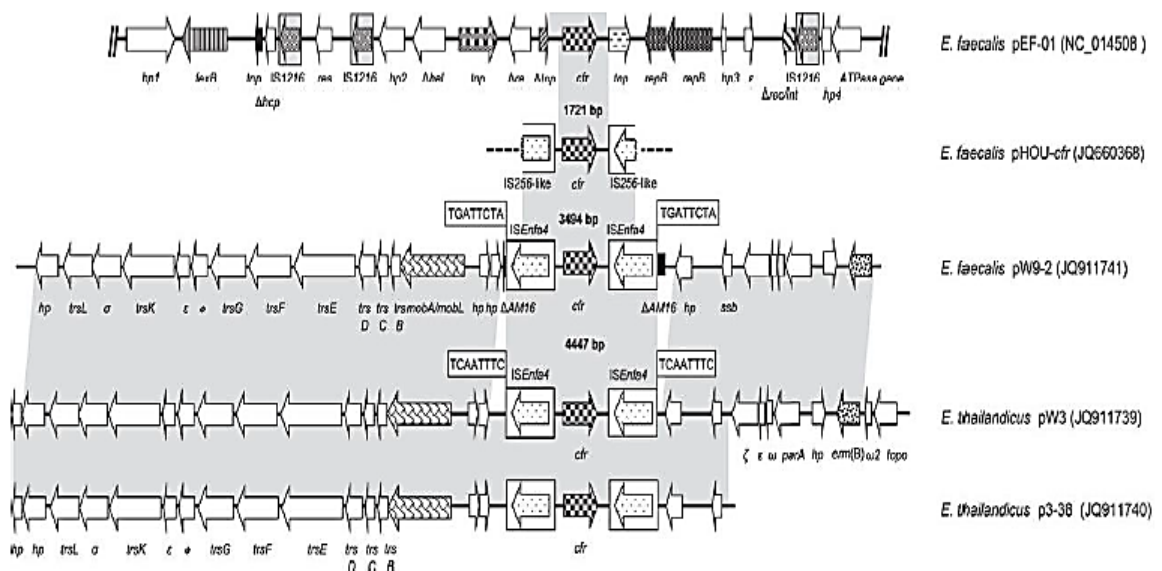


FIGURA 7. Confronto dei contesti genetici del gene *cfr* in plasmidi di *Enterococcus* spp. Tratto da Shen *et al.*

1.2.4 Il gene *cfr*(B)

Uno studio condotto da Marin *et al.* (2015), porta l'attenzione sulla presenza di un gene *cfr*-like osservato in 7 ceppi clinici di *Peptoclostridium difficile*. L'analisi di sequenza ha evidenziato una notevole differenza tra i *cfr* clostridiali e il gene *cfr* di *S. sciuri*. L'identità aminoacidica del 75% tra la proteina codificata dal nuovo gene e quella comunemente rilevata negli stafilococchi e negli enterococchi, ha suggerito che il gene di *P. difficile* potesse codificare per un meccanismo di resistenza diverso (Schwarz & Wang, 2015). Nel corso del SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012-2013) il gene in questione è stato identificato in due isolati clinici di *E. faecalis* che mostravano elevati valori di MIC di linezolid, vancomicina, teicoplanina (fenotipo VanA), gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina. Inoltre, oltre ad essere *cfr*-positivi, i due isolati mostravano la mutazione G2576T su un allele dell'rRNA 23S; non erano invece rilevate modificazioni nelle proteine ribosomiali L3 e L4. Questo gene *cfr*-like, in grado di conferire resistenza a linezolid, venne indicato con il nome di *cfr*(B) (Deshpande *et al.*, 2015). Venne inoltre descritto il contesto genetico nel quale il gene si trova (Figura 8). La sequenza nucleotidica di *cfr*(B), rispetto a quella di *cfr* del plasmide pSCFS1, è apparsa molto simile (99,7%) a quelle descritte in *P.*

difficile (GenBank KM359438, KM359439, CP003939, HG002389 e HG002396).

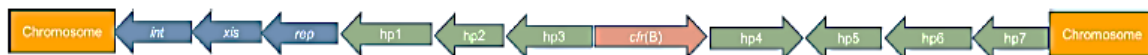


FIGURA 8. Rappresentazione schematica della sequenza di DNA che circonda *cfr(B)*. Tratto da Deshpande *et al.*

Inoltre, nonostante un'identità nucleotidica piuttosto bassa con i geni *cfr* di *S. sciuri* e di *S. aureus*, condivide con essi un dominio conservato e fa parte della stessa famiglia di S-adenosil metionina-metiltrasferasi (Deshpande *et al.*, 2015).

1.2.5 Il gene *cfr(C)*

Nel 2017, Tang *et al.* identificarono in un isolato di *Campylobacter coli* un gene *cfr*-like, in seguito chiamato *cfr(C)*. Il ceppo risultava resistente a diverse classi di antibiotici e mostrava una MIC di florfenicolo pari a 32 mg/L. Grazie ad esperimenti di trasferibilità genica e di PFGE, si evidenziò la presenza di un plasmide coniugativo di 47 ORF (48 kb) con alcuni geni che codificavano per proteine con funzione nota. In particolare, venne individuato un gene (1.140 bp) codificante per una proteina di 379 aa che mostrava

elevata similarità con enzimi della superfamiglia delle S-adenosilmetionine, ma con identità del 55.1% e 54.9% rispettivamente con *cfr* di *S. sciuri* e *cfr(B)* di *E. faecium*. Si ipotizzò che questo gene codificasse per una nuova proteina in grado di conferire resistenza agli antibiotici. Ad oggi, *cfr(C)* è stato principalmente identificato in isolati di *C. coli* e gli isolati *cfr(C)*-positivi derivavano da diversi allevamenti di bestiame situati in due stati diversi (Tang *et al.*, 2017).

1.2.6 Il gene *optrA*

Il gene *optrA* (oxazolidinone phenicol transferable resistance) è stato identificato per la prima volta nel 2015 in Cina in un isolato clinico di *E. faecalis* (E349) linezolid-resistente ma negativo per la presenza di *cfr* e mutazioni ribosomiali (Wang *et al.*, 2015). Da allora, enterococchi *optrA*-positivi sono stati segnalati in tutto il mondo (Mendes *et al.*, 2016). Il gene è risultato essere localizzato su un plasmide, denominato pE349, di 39 ORF di cui 18 codificano per proteine con funzione nota: OptrA e FexA coinvolte nella resistenza, RepB e RepC nella replicazione plasmidica, e MobA, PrgI, TraE, Tnp e TraG negli eventi coniugativi (Figura 9) (Wang *et al.*, 2015). *optrA*, responsabile della resistenza a fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo)

e oxazolidinoni (incluso il tedizolid), fa parte della famiglia di proteine ABC-F, ed è filogeneticamente correlata a Vga(A), Vga(C), Vga(E) e Lsa(E) che conferiscono resistenza a lincosamidi, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A (Wang *et al.*, 2015).

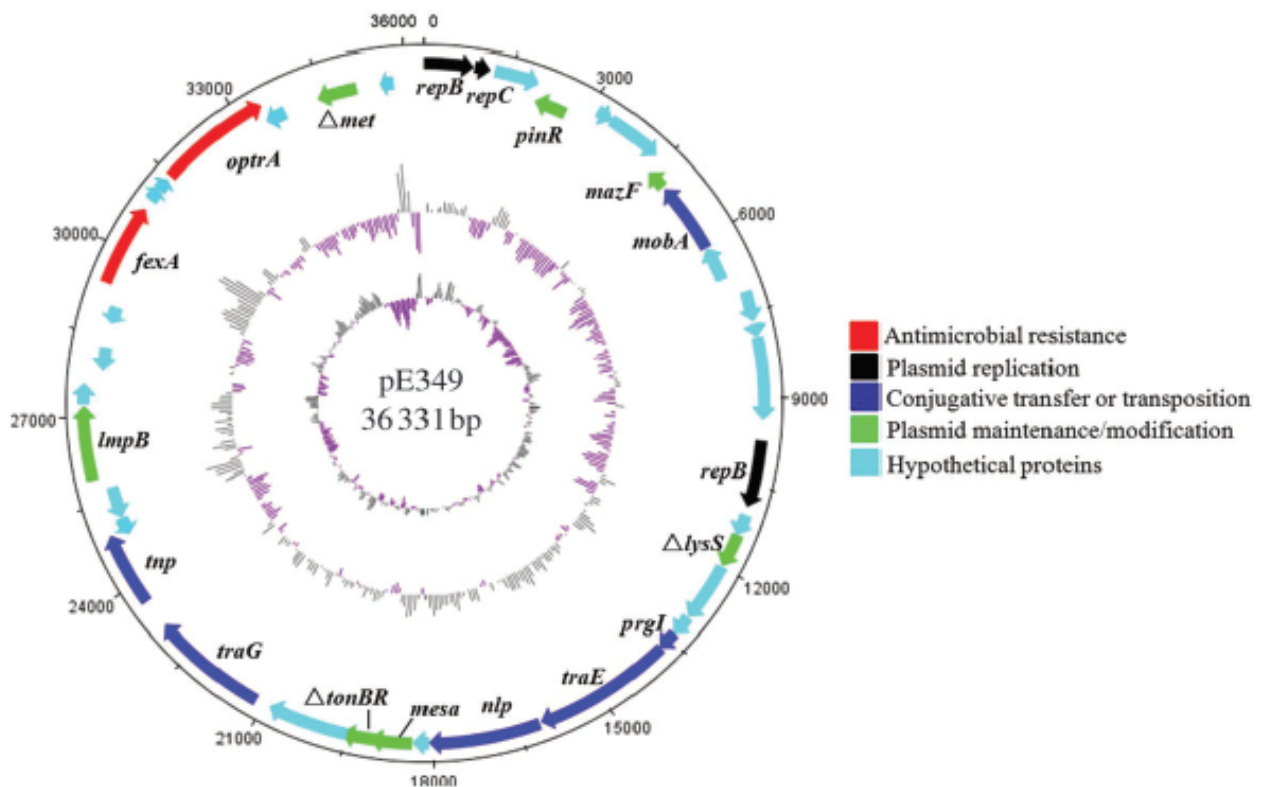


FIGURA 9. Rappresentazione schematica del plasmide pE349 di *E. faecalis* E349
Tratto da Wang *et al.*

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, diversamente da come era stato inizialmente ipotizzato, *optrA* non codifica un sistema di efflusso attivo, ma

determina una ridotta accessibilità o affinità dei farmaci ai siti legame della subunità 50S, con conseguente protezione del ribosoma (Li *et al.*, 2019). Un recente studio ha messo in evidenza come proteine della famiglia ABC-F conferiscano la capacità di inibire la traduzione di inibitori dell'allungamento, i quali intrappolano il tRNA nel sito P del ribosoma (Ero *et al.*, 2019) (Figura10).

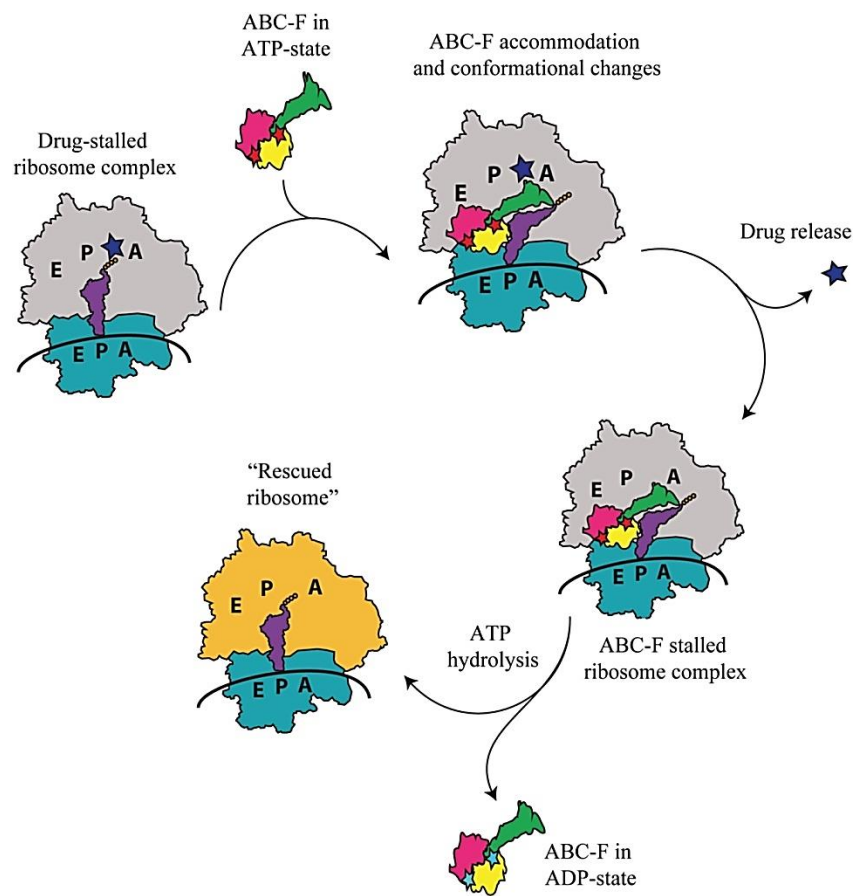


FIGURA 10. Rappresentazione schematica del meccanismo di protezione ribosomiale da parte delle proteine ABC-F. La stella blu indica il sito PTC/NPET, target dell'antibiotico. Le stelle rossa e azzurra indicano, rispettivamente, il legame della proteina ABC-F con ATP e ADP. Tratto da Ero *et al.*

Nel 2016, *optrA* è stato identificato anche in Italia in due isolati clinici di *E. faecium* positivi anche per il gene *cfr* che, tuttavia, non era espresso (Brenciani 2016 JAC lettera).

Dal confronto di tutte le varianti *optrA* finora descritte è emerso che quella italiana (*optrA*-E35048) differisce dal WT molto più (20 sostituzioni aminoacidiche) di quanto non avvenga con le varianti cinesi che mostrano un limitato numero di sostituzioni (Morrone *et al.*, 2017). Allo stesso tempo, non è ancora del tutto chiaro come queste sostituzioni vadano ad impattare sul fenotipo di resistenza a fenicoli e oxazolidinoni. Nel 2019 Li *et al.*, identificano in un ceppo di *E. faecalis* di origine suina, un nuovo trasposone cromosomico della famiglia Tn554 chiamato Tn6674 (12,932 bp), che trasporta anche altri geni di resistenza come *spc*, *erm(A)*, e *fexA*.

Il gene *optrA*, oltre che in *Enterococcus* spp., è stato identificato anche in ceppi di *S. sciuri* di origine suina (Li *et al.*, 2016).

1.2.7 Co-localizzazione plasmidica di *cfr* e *optrA*

Indagini più dettagliate su uno dei due enterococchi clinici *optrA*- e *cfr*-positivi isolati in Italia (*E. faecium* E35048) hanno portato alla caratterizzazione di un plasmide di 41,8 kb (pE35048-oc) sul quale i due determinanti di resistenza risiedono ad una distanza di circa 23.1 kb.

pE35048-oc possiede regioni con elevata similarità (96% di identità nucleotidica) con pRE25 (50 kb) (Schwarz *et al.*, 2000). Una co-localizzazione di *optrA* e *cfr* è stata riportata anche in un altro plasmide di 72,9 kb (pF120805,) isolato in un ceppo clinico di *E. faecium* (Lazaris *et al.*, 2017). Le due strutture che condividono lo scheletro pRE25-correlato, e i relativi contesti genetici di *optrA* e *cfr*, sono messi a confronto in Figura 11.

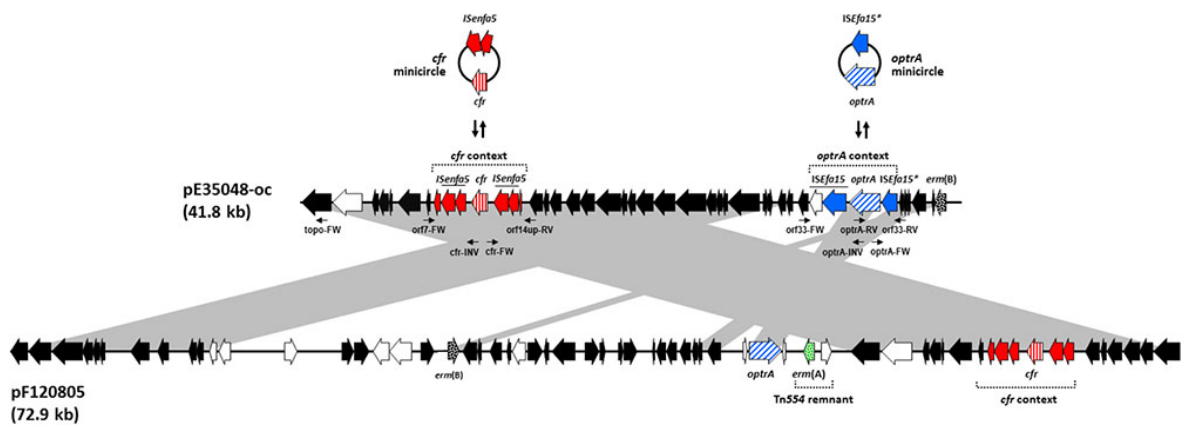


FIGURA 11. Confronto dei contesti genetici di *cfr* ed *optrA* di pE35048-oc di *E. faecium* E35048 e di pF120805 di *E. faecium* F120805. Tratto da Morroni *et al.*

Dall'analisi dei contesti genetici dei geni di linezolid-resistenza nei due plasmidi, non si rilevano differenze tra gli ambienti genetici di *cfr*, mentre emergono differenze sostanziali per quanto riguarda quelli *optrA*. In pEF12-0805, infatti, il gene è associato alla porzione di Tn554 che porta *erm(A)*, mentre in pE35048-oc il contesto *optrA* è localizzato a valle del gene *erm(B)*.

Va inoltre sottolineato che, a differenza di quanto si verifica in pE35048-oc, in pEF12-0805 l'assenza di sequenze d'inserzione ai lati di *optrA* non ne consente l'escissione. La presenza di IS del tipo IS1216E (con lo stesso orientamento o orientamento opposto) a fiancheggiare *optrA* promuove la formazione di minicircle attraverso la ricombinazione tra le due copie di IS (Figura 12). Il gene *optrA*, inoltre, risulta spesso associato ad altri determinanti di resistenza, in modo particolare *fexA* (He *et al.*, 2016).

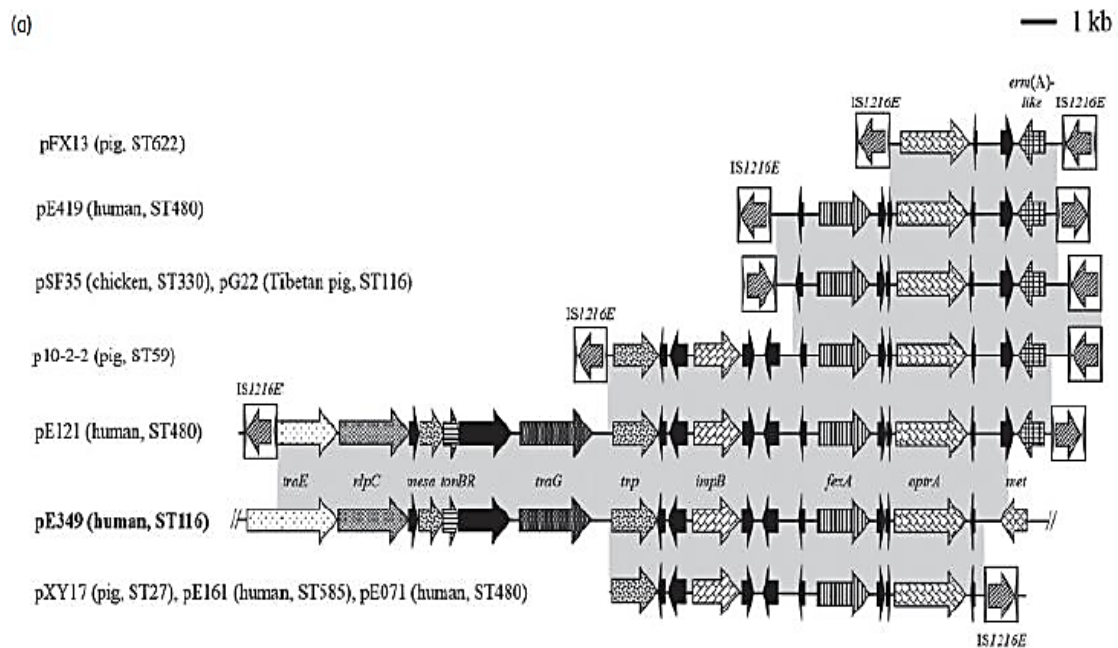


FIGURA 12. Rappresentazione schematica e confronto dei contesti di *optrA* in nove plasmidi di *E. faecalis*. Il plasmide pE349 (in grassetto) viene incluso nel confronto. Le regioni con identità di sequenza nucleotidica $\geq 98\%$ sono evidenziate in grigio. Tratto da He *et al.*

1.2.8 Il gene *poxA*

Il gene *poxA* è stato identificato per la prima volta in un MRSA linezolid-resistente (AOUC-0915) isolato da un paziente affetto da fibrosi cistica. Il gene codifica per una proteina appartenente alla famiglia di proteine ABC-F spesso coinvolte nell'antibiotico-resistenza tramite meccanismi di protezione ribosomiale. *poxA* è responsabile, infatti, di una ridotta sensibilità a fenicoli (florfenicolo e cloramfenicolo), oxazolidinoni (linezolid e tedizolid) e tetracicline (tetraciclina e doxiciclina).

Nel 2019, Papagiannitsis *et al.* segnalano il primo ceppo clinico di *E. faecium* *poxA*-positivo in Grecia.

Tuttavia, la maggior parte dei ceppi *poxA*-positivi descritti ad oggi è di origine animale (Elghaieb *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019). Ciò ha indotto a ritenere che la selezione del gene possa essere avvenuta nel serbatoio animale come del resto si è verificato anche per altri geni di resistenza (ai fenicoli, alla tetraciclina e ad altri antibiotici ampiamente utilizzati in medicina veterinaria). Per confermare il ruolo di *poxA* nell'antibiotico-resistenza, si è fatto uso del clonaggio: l'espressione del gene in ceppi di *Escherichia coli*, *S. aureus* ed *E. faecalis* ha dimostrato che esso è in grado di ridurre la sensibilità ai fenicoli, agli oxazolidinoni e alle

tetracicline (tetraciclina e doxyciclina). Inaspettatamente, quando espresso in *E. coli*, *poxtA* produceva una diminuzione della sensibilità agli oxazolidinoni più marcata di quanto avveniva esprimendo il gene in cocchi Gram-positivi (Antonelli *et al.*, 2018). Ciò potrebbe essere dovuto a differenze nel livello di espressione genica o a differenze nell'interazione di *poxtA* con il target ribosomiale nelle diverse specie. *poxtA* è localizzato sul trasposone Tn6349 integrato sul cromosoma batterico; l'inserzione interrompe la sequenza codificante una ATPasi del profago ϕ N315-like (Figura 13).

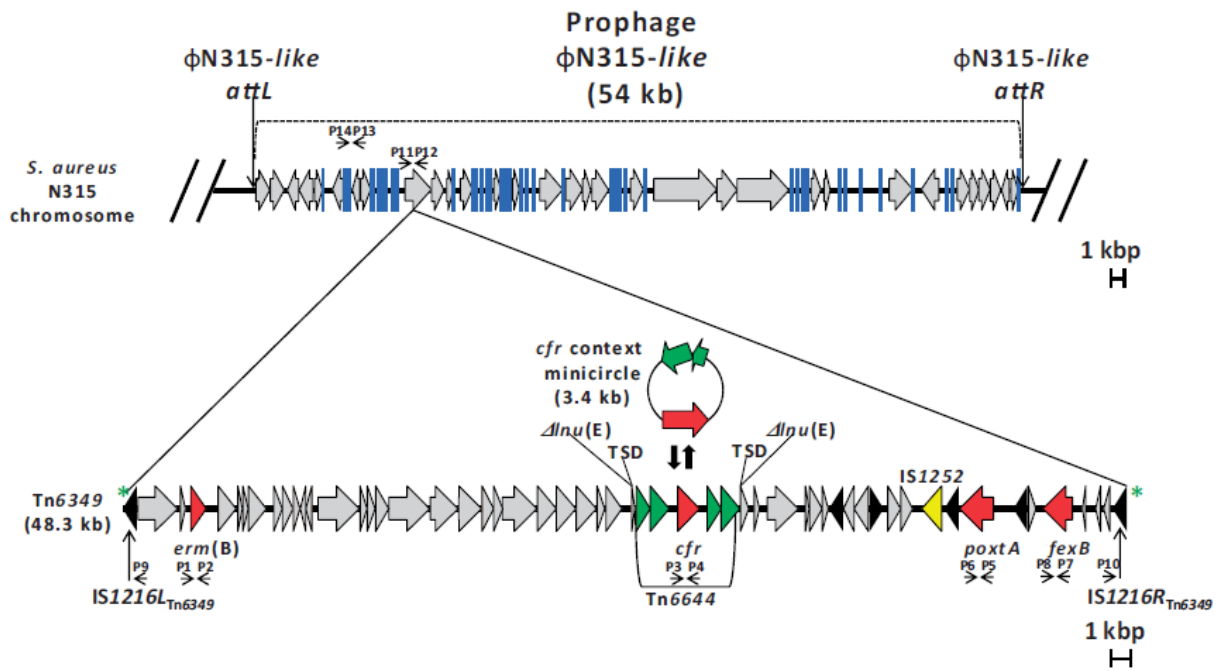


FIGURA 13. Struttura di Tn6349 e dei contesti genetici; integrazione nel cromosoma dell'MRSA AOUC-0915. Tratto da D'Andrea *et al.*

Il trasposone è delimitato da due identiche sequenze di inserzione, disposte con lo stesso orientamento e indicate come IS1216_LTn6349 e IS1216_RTn6349. Inoltre, risulta fiancheggiato da una piccola sequenza diretta e ripetuta di 8 bp (5'-AAACAAAT-3'), coinvolta nel meccanismo di duplicazione e trasposizione dell'elemento genetico.

Oltre a *poxA*, Tn6349 porta altri tre geni di resistenza, ovvero *cfr* (responsabile del fenotipo di resistenza PhLOPSa), *erm*(B) (responsabile del fenotipo di resistenza MLS_B) e *fexB* (responsabile della resistenza ai fenicoli). La struttura a mosaico di Tn6349 ha suggerito che questo elemento abbia avuto origine dalla ricombinazione tra un plasmide pE35048-oc-like e il trasposone composito Tn6657 che porta *poxA* e *fexB*, seguito dalla co-integrazione nel profago (D'Andrea *et al.*, 2019).

Una ricerca con BLAST ha rivelato la presenza di questo determinante di resistenza in altri batteri Gram-positivi inclusi *E. faecium* e *Pediococcus acidilactici*. Rispetto al contesto genetico di *poxA* in AOUC-0915, in *P. acidilactici* la IS1216, a monte del gene *poxA*, ha orientamento opposto, mentre in *E. faecium* è presente una sola copia di IS1216, posizionata a valle del gene (Figura 14).

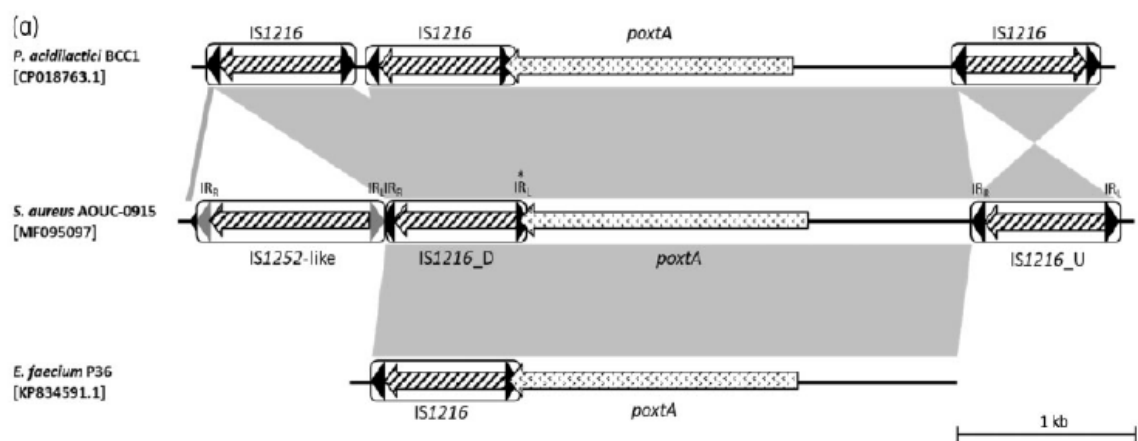


FIGURA 14. Confronto dei contesti genetici di *poxtA* in *P. acidilactici* BCC1, in *E. faecium* P36 e in *S. aureus* AOUC-0915. Le regioni con identità nucleotidica > 99% sono connesse da aree grigie. Tratto da Antonelli *et al.*

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento ed isolamento di enterococchi florfenicolo-resistenti da campioni fecali

Il campionamento è stato progettato in modo da essere rappresentativo della produzione suinicola della regione Marche [Marche Alte (Aree Vaste 1 e 2) e Marche Basse (Aree Vaste 3, 4 e 5)], escludendo piccoli allevamenti (Figura 15).

In collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Perugia (sede di Fermo), tra aprile 2018 e luglio 2019, sono stati visitati 82 allevamenti da ingrasso (con almeno 200 suini) o da riproduzione (con almeno 20 scrofe), sia a ciclo aperto, che a ciclo chiuso.

In ciascun allevamento, in punti diversi dell'azienda agricola, sono stati raccolti tre pool fecali conformemente alle linee guida di campionamento previste dal piano di monitoraggio nazionale tedesco nella produzione primaria della filiera bovina, suina e di polli da ingrasso (Hille *et al.*, 2017).

Tutti i campioni fecali sono stati raccolti da animali in fase di post-svezzamento ritenuta la più critica riguardo alla somministrazione di antibiotici.

Ciascun pool fecale è stato inoculato in acqua peptonata contenente florfenicolo (10 mg/L) ed incubato a 44 ° C per 48 ore. Successivamente, 100 µl della brodocoltura, erano seminati su piastre di Slanetz Bartley agar contenenti florfenicolo (10 mg/L).

In caso di crescita su questo terreno selettivo, veniva selezionata una sola colonia enterococcica per ciascun pool. Gli enterococchi florfenicolo-resistenti (uno per piastra/pool fecale) erano preliminarmente identificati a livello di specie mediante gallerie API Rapid ID32 Strep (bioMérieux) (Vitek-MS, bioMérieux); l'identificazione dei ceppi con almeno un gene di resistenza agli oxazolidinoni (vedi dopo) erano confermati mediante MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux).

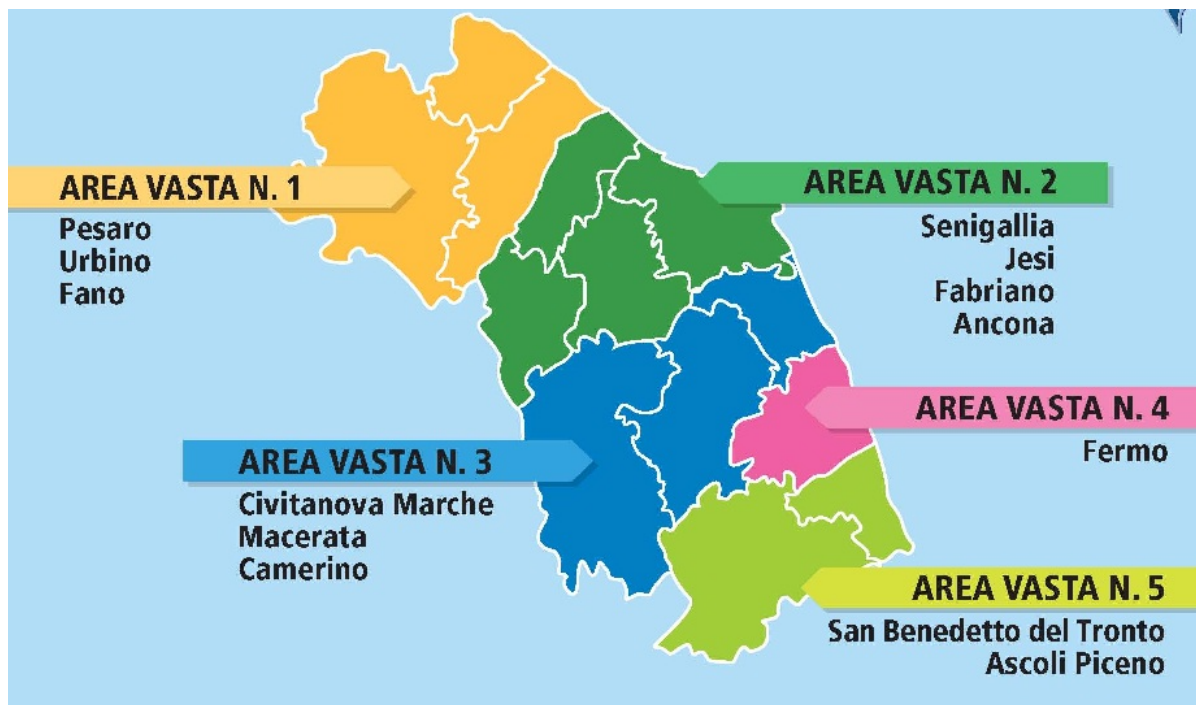


Figura 15. Regione Marche, città e relative Aree Vaste.

2.2 Antibiotici e test di sensibilità

Tutti gli antibiotici utilizzati nei test di sensibilità, ad eccezione del tedizolid, sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Co, Milano). Prima dei saggi, florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tetraciclina venivano risospesi ad una concentrazione finale di 10 g/L nei solventi appropriati (etanolo per il florfenicolo e per il cloramfenicolo, acqua per il linezolid e tetraciclina) e conservati a -20°C. Per quanto riguarda il tedizolid, non disponendo della

polvere, si è fatto uso di strip per Etest (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia). La MIC è stata determinata mediante microdiluizione in brodo o attraverso Etest e i valori ottenuti sono stati interpretati coerentemente con i *breakpoint* suggeriti dal CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (Tabella 2). *S. aureus* ATCC 29213 ed *E. faecalis* ATCC 29212 sono stati usati come ceppi di riferimento.

	Breakpoint <i>Enterococcus</i> spp. (mg/L)			Breakpoint <i>Staphylococcus</i> spp. (mg/L)		
	S	I	R	S	I	R
Florfenicolo	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cloramfenicolo	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32
Linezolid	≤ 2	4	≥ 8	≤ 4	-	≥ 8
Tedizolid	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 0,5	-	≥ 1
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	≤ 4	8	≥ 16

Tabella 2. *Breakpoint* suggeriti dal CLSI relativi agli antibiotici saggiati. Dal momento che il florfenicolo non viene usato in pratica clinica, ma è ad esclusivo uso veterinario, non sono disponibili *breakpoint*

*N.D. non disponibile.

2.3 Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale dei ceppi batterici è stata eseguita mediante due diversi kit: il *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma) e il kit di estrazione della Thermo Fisher Scientific. Nel caso del primo kit, i ceppi batterici erano inoculati in *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37 °C; le brodocolture così ottenute erano prima centrifugate (13.000 g per 2 minuti) e poi risospese in 200 µl di *Lysozyme Solution* contenente lisozima (Sigma) alla concentrazione finale di 45 mg/ml. Seguiva un'incubazione a 37°C per 1 ora. Al termine dell'incubazione, si proseguiva con la digestione delle proteine mediante 200 µl di *Lysis Solution* e 20 µl di Proteinasi K (Sigma); per rendere efficace la digestione, i campioni venivano mantenuti a 55°C per 10 minuti. Alla sospensione, erano poi aggiunti 200 µl di etanolo assoluto che veniva mescolato invertendo più volte i campioni. A questo punto si trasferiva tutta la soluzione nelle colonnine fornite dal kit precedentemente attivate. Dopo una centrifugazione a 6.500 g per 1 minuto, si eliminava l'eluato e si procedeva con 2 lavaggi con 500 µl di *Wash Solution*.

Alle colonnine, trasferite in nuove eppendorf, si aggiungevano 200 µl di *Elution Solution* e si centrifugava a 6.000 g per 1 minuto per recuperare il DNA. I campioni venivano conservati ad una temperatura di -20°C.

Nel caso del secondo kit, invece, il campione proveniente da coltura in piastra, era inizialmente stemperato in 1 ml d'acqua e centrifugato per 6 minuti. Il pellet ottenuto era quindi risospeso in 180 μ l di *Lysis buffer* (contenente acqua, Tris HCl 1M, EDTA 0,5 M e Triton x-100) e 3,6 mg di lisozima per ogni campione. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C, a ciascun campione venivano aggiunti 200 μ l di *Lysis solution* e 20 μ l di Proteinasi K; si procedeva ad una incubazione di 30 minuti a 56 °C. Successivamente, venivano aggiunti 20 μ l di RNAsi e i campioni erano incubati per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni, dopo l'aggiunta di 400 μ l di etanolo al 50%, erano quindi vortexati. Infine, dopo aver trasferito il contenuto della eppendorf in una colonnina già attivata fornita dal kit, si procedeva con una centrifugazione di un minuto. Seguivano due lavaggi con 500 μ l di *Wash buffer*, l'eluizione con 200 μ l di *Elution buffer* e infine, una centrifugazione per un minuto per ottenere il DNA.

2.4 Caratterizzazione genotipica degli enterococchi florfenicolo-resistenti

Gli enterococchi florfenicolo-resistenti selezionati su Slanetz Bartley contenente florfenicolo (10 mg/L), sono stati sottoposti a *screening* mediante PCR per la presenza dei geni di resistenza al linezolid: *cfr*, *optrA* e *poxA*. Le coppie di primer utilizzate nelle reazioni di amplificazione sono riportate in Tabella 3.

Gli ampliconi sono stati ottenuti utilizzando la *Dream Taq polymerase* (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')	Dimensione amplicon (bp)
<i>cfr</i>	cfr-fw	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746
	cfr-rv	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	
<i>optrA</i>	optrA-FW	TACTTGATGAACCTACTAACCA	422
	optrA-RV	CCTTGAACTACTGATTCTCGG	
<i>poxA</i>	poxA-FW	GAACGCTTGGAGTATTCGACTTC	778
	poxA-RV	CTGGACTGAGAATACCCATC	

Tabella 3. Primer utilizzati in questo studio.

I prodotti di PCR erano 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 1kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

2.5 Tipizzazione

2.5.1 SmaI-PFGE

La tipizzazione degli isolati è stata effettuata mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). La metodica prevede la restrizione del genoma batterico con enzimi che tagliano infrequentemente il DNA e originano un ridotto numero di frammenti (5-20) con elevato peso molecolare (fino a 10 Mb). I frammenti ottenuti vengono separati utilizzando l'elettroforesi in campo pulsato che, a differenza dell'elettroforesi convenzionale, sfruttando un campo elettrico pluridirezionale, consente la separazione di frammenti di grandi dimensioni. Per ciascun ceppo batterico è stato così ottenuto un profilo di restrizione specifico (fingerprint).

La tecnica è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Ripa *et al.* (Ripa *et al.*, 2001). Un ml della brodocoltura overnight (ad una concentrazione di DNA pari a 10 µg/ml) veniva centrifugato e lavato con 0,5 ml di *TEN Buffer* (Tris EDTA NaCl). Il pellet era risospeso in 0,5 ml di *TEN Buffer* cui si aggiungeva un uguale volume di *low-melting-point agarose* (Bio-Rad, Hercule, USA) all'1,6%. La sospensione veniva quindi introdotta in appositi stampi (plug-mold) fino alla solidificazione delle “plug” le quali erano poi incubate a 37°C per 24 ore in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1 mg/mL) e RNasi A (50 µg/ml) (Sigma). Ad ogni plug venivano quindi aggiunti 3 ml di *Digestion Buffer* contenente proteinasi K (0,5 µg/ml); si procedeva con una nuova incubazione a 50°C per 24 ore. A questo punto si effettuavano 3 lavaggi con 10 ml di *TE Buffer* (Tris EDTA). Metà plug veniva incubata overnight con 30 U di SmaI (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. La restrizione veniva interrotta aggiungendo 1 ml di EDTA 0,5 M. Successivamente ciascuna plug veniva posta su un pettine ed inclusa in un gel di *Pulsed Field Certified Agarose* (Bio-Rad) all'1%. Le corse elettroforetiche in *TBE* (Tris Borato EDTA) *Buffer* sono state effettuate tramite l'apparecchiatura *Chef Mapper XA System* (Bio-Rad) con le seguenti condizioni: tempo 22 ore, campo 6 V/cm, switch iniziale 1 secondo, switch finale 30 secondi, ramping factor lineare. Come pesi molecolari di riferimento

sono stati utilizzati: *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, Ipswich, USA) e *Lambda Marker* (Promega, Madison, USA). Il gel è stato, infine, colorato con bromuro d'etidio (0,5 mg/mL) e visualizzato al transilluminatore.

2.6 Saggi di trasferibilità

2.6.1 Coniugazione su filtro

Tutti gli enterococchi che possedevano uno o più geni di resistenza al linezolid sono stati utilizzati come donatori in esperimenti di coniugazione su filtro. *E. faecium* 64/3 (Werner 97) ed *E. faecalis* JH2-2, due ceppi di laboratorio sensibili a linezolid (MIC \leq 2 mg/L e 0,5 mg/L, rispettivamente) e florfenicolo (MIC \leq 4 mg/L per entrambi) erano impiegati come riceventi.

Negli esperimenti, donatore e ricevente, venivano fatti crescere in BH brodo fino al raggiungimento di una OD₆₇₅ di 0,4 e poi filtrati attraverso filtri di nitrocellulosa da 0,45 μ m (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Il filtro, rimosso sterilmente dall'apparato per filtrazione, veniva posizionato al centro di una piastra preriscaldata di BH agar e incubato overnight a 37°C. Successivamente, i batteri adesi sulla superficie del filtro

venivano rimossi immergendolo in 10 ml di soluzione fisiologica sterile e vortexando. La sospensione batterica veniva quindi centrifugata a 8.000 rpm per 10 minuti; il pellet così ottenuto era risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. Si procedeva quindi con le diluizioni scalari fino alla 10^{-15} . Piastre selettive di BH erano inoculate con 10 μ l di tutte le diluizioni per la conta delle CFU/ml di donatore e ricevente. Per la selezione dei transconiuganti, 100 μ l di sospensione batterica (dell'intero e delle diluizioni fino alla 10^{-5}) venivano spatolati alla superficie di piastre di BH contenenti florfenicolo (8 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Dopo 24/48 ore di incubazione a 37°C si procedeva alla conta delle colonie. La frequenza di trasferimento era espressa come numero di UFC/ml di transconiugante per ricevente e per donatore.

I transconiuganti ottenuti negli esperimenti di coniugazione erano testati per la presenza di geni di resistenza al linezolid mediante PCR e per la loro sensibilità a florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tedizolid. Inoltre, mediante SmaI-PFGE, si è analizzato il background genetico di riceventi e transconiuganti.

2.7 S1-PFGE

La S1-PFGE è stata eseguita per valutare il plasmidoma dei ceppi utilizzati come donatori. Con alcune modifiche, il procedimento seguito è sovrapponibile a quello descritto nel paragrafo 2.6.1. In questi esperimenti tuttavia il DNA batterico veniva digerito con S1-nuclease (ThermoFisher Scientific); le condizioni di corsa per la risoluzione dei plasmidi prevedevano un campo elettrico di 6 V/cm, switch iniziale 1 secondo e switch finale 20 secondi, e ramping factor lineare.

2.8 Southern blotting e ibridazione

I frammenti generati dalla restrizione con S1 e separati con la PFGE, venivano trasferiti su di una membrana di nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) mediante trasferimento capillare. A tale scopo il gel, dopo essere stato prima depurinato e poi denaturato, era messo a contatto con la membrana in un contenitore, contenente l'opportuno tampone, in grado di favorire la capillarità e conseguentemente anche il trasferimento di DNA.

Successivamente si procedeva prima con una fase di fissaggio del DNA alla membrana di nylon mediante irradiazione UV e poi una pre-ibridazione a 50°C per 2 ore in tampone Ultra-hyb (Ultrasensitive Hybridization Buffer)

(Applied Biosystems, Foster City, USA). Veniva quindi aggiunta la sonda marcata con biotina. La sonda era ottenuta precedentemente mediante PCR utilizzando come stampo il DNA di ceppi già caratterizzati; gli ampliconi ottenuti erano purificati e successivamente marcati con biotina utilizzando il kit Psoralen-Biotin BrightStar (Ambion, ThermoFisher Scientific). Le sonde erano denaturate a 100°C per 10 minuti e messe a contatto con la membrana. Per favorire il processo di ibridazione, membrana e sonda, erano incubate overnight in leggera agitazione. Il giorno successivo la membrana veniva sottoposta a 6 lavaggi in condizioni di forza ionica decrescente mediante SCC Buffer (saline-sodio citato) e SDS al fine di rimuovere la sonda in eccesso. A questo punto si effettuava la rilevazione del segnale secondo le indicazioni del kit di marcatura. Con l'aggiunta di streptavidina il segnale luminoso prodotto dall'interazione con la biotina poteva essere impresso su lastra fotografica. In caso di positività, la banda di ibridazione indicava la localizzazione plasmidica o cromosomica del gene.

3. RISULTATI

3.1 Ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti, saggi di PCR e test di sensibilità

Complessivamente sono stati analizzati 246 pool fecali raccolti presso 82 allevamenti suini dislocati nella regione Marche; 140/246 (56.9%) campioni sono risultati positivi per la presenza di enterococchi resistenti al florfenicolo.

140 enterococchi florfenicolo-resistenti [su ciascuna piastra di Slanetz Bartley con florfenicolo (10 mg/L) è stata selezionata una sola colonia] sono stati saggiati mediante PCR per la presenza di determinanti di resistenza agli oxazolidinoni (*optrA*, *cfr* e *poxxA*).

31/140 isolati — 15 *E. faecalis*, 6 *E. faecium*, 3 *Enterococcus hirae*, 4 *Enterococcus avium*, 2 *Enterococcus gallinarum* e un *Enterococcus thailandicus* — possedevano almeno un gene di resistenza al linezolid (Tabella 4). Complessivamente, il gene *optrA* è risultato essere prevalente, essendo stato rilevato in 24/31 enterococchi, mentre *cfr* e *poxxA* sono stati trovati in 6/31 e 8/31 isolati rispettivamente.

Tuttavia, va sottolineato che il gene *optrA* è risultato essere strettamente associato alla specie *E. faecalis* (15/15 isolati); nei rimanenti 16 enterococchi

appartenenti a specie diverse da *E. faecalis*, i geni *optrA* e *poxA* risultavano entrambi diffusi (9/16 e 8/16, rispettivamente). *cfr* era presente in 6/16 ceppi, quasi sempre in associazione con il gene *optrA* (5/6).

I 31 enterococchi con geni di resistenza agli oxazolidinoni sono stati, inoltre, caratterizzati fenotipicamente mediante determinazione della MIC di florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid, tedizolid e tetraciclina (Tabella 4).

Isolato	Specie	Geni di resistenza agli oxazolidinoni			MIC (mg/L)				
		<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>	LZD	TZD	FFC	CHL	TE
S183	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	1	32	64	64
S184	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	2	64	128	64
S217	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	2	32	64	128
S219	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	1.5	32	128	128
S221	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	2	32	64	64
S224	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	2	64	128	128
S232	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	3	128	128	128
S338	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	1	2	64	64	128
S339	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	4	128	>128	128
S340	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	2	128	>128	128
S341	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	8	4	>128	>128	128
S377	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	2	32	32	128
S379	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	1.5	64	>128	>128
S380	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	4	2	64	128	>128
S381	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	2	2	128	128	>128
15		15	0	0	1-8	1.5-4	32->128	32->128	64-128
S156	<i>E. faecium</i>	-	-	+	8	4	>128	32	128
S157	<i>E. faecium</i>	+	-	+	8	3	>128	32	32
S194	<i>E. faecium</i>	-	-	+	4	1.5	64	16	128
S195	<i>E. faecium</i>	-	-	+	2	1	64	16	128
S297	<i>E. faecium</i>	+	-	+	4	1.5	>128	64	128
S345	<i>E. faecium</i>	+	-	-	4	2	128	>128	128
6		3	0	5	2-8	1-3	64->128	16->128	32-128
S212	<i>E. hirae</i>	-	-	+	8	1.5	128	64	128
S214	<i>E. hirae</i>	-	-	+	8	1.5	128	32	128
S251	<i>E. hirae</i>	+	+	-	4	2	64	16	64

Isolato	Specie	Geni di resistenza agli oxazolidinoni			MIC (mg/L)				
		<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>	LZD	TZD	FFC	CHL	TE
	3	1	1	2	4-8	1.5-2	64->128	16-64	64->128
S173	<i>E. avium</i>	-	+	-	1	0.25	32	32	32
S176	<i>E. avium</i>	+	+	-	2	1.5	32	16	32
S193	<i>E. avium</i>	+	-	-	1	0.5	16	16	32
S252	<i>E. avium</i>	+	+	-	4	0.75	32	16	32
	4	3	3	0	1-4	0.25-1.5	16-32	16-32	32
S325	<i>E. gallinarum</i>	+	+	-	0.5	0.75	64	64	>128
S356	<i>E. gallinarum</i>	-	-	+	4	1.5	>128	64	128
	2	1	1	1	0.5-4	0.75-1.5	64->128	64	128->128
S155	<i>E. thailandicus</i>	+	+	-	4	2	>128	>128	64
	1	1	1	0	4	2	>128	>128	64
	31	24	6	8	0.5-8	0.25-4	16->128	16->128	32->128

Tabella 4. Genotipo e fenotipo dei 31 enterococchi che possiedono almeno un gene di resistenza agli oxazolidinoni.

LZD, linezolid; TDZ, tedizolid; FFC, florfenicolo; CHL, cloramfenicolo; TE tetraciclina.

3.2 Tipizzazione degli isolati mediante SmaI-PFGE

I 31 enterococchi sono stati sottoposti a tipizzazione mediante SmaI-PFGE. I pulsotipi ottenuti sono stati raggruppati per specie e confrontati tenendo conto del numero e della dimensione delle bande sul gel.

Per quanto riguarda i 15 ceppi di *E. faecalis*, solo gli isolati *S379*, *S380* e *S381* sono risultati essere strettamente correlati; gli altri ceppi, al contrario, non mostravano alcuna correlazione (Figura 16).

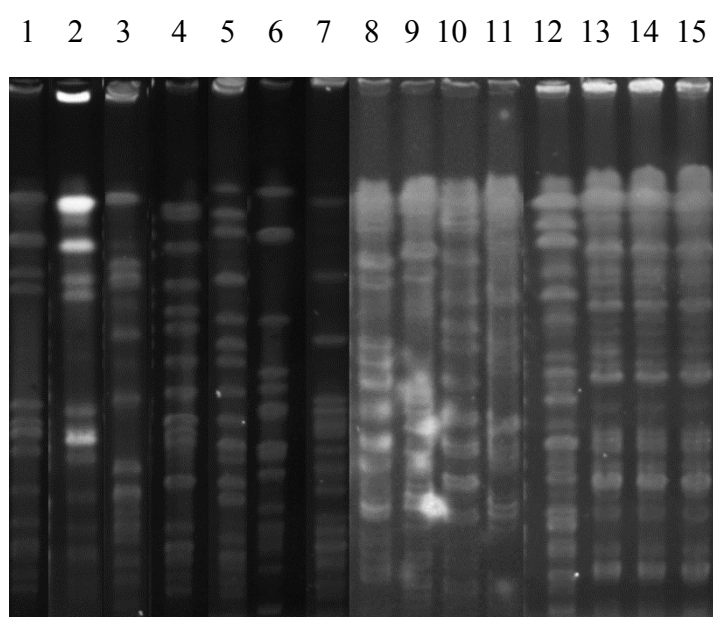


FIGURA 16. SmaI-PFGE degli isolati di *E. faecalis*: **1**, S183; **2**, S184; **3**, S217; **4**, S219; **5**, S221; **6**, S224; **7**, S232; **8**, S339; **9**, S338; **10**, S340; **11**, S341; **12**, S377; **13**, S379; **14**, S380; **15**, S381.

Anche gli enterococchi appartenenti alle specie *E. faecium* (n=6) ed *E. thailandicus* (n=1) (Figura 17 A), *E. hirae* (n=3) (Figura 17 B), *E. avium* (n=4) (Figura 17 C), *E. gallinarum* (n=2) (Figura 17 D) non erano correlati da un punto di vista epidemiologico.

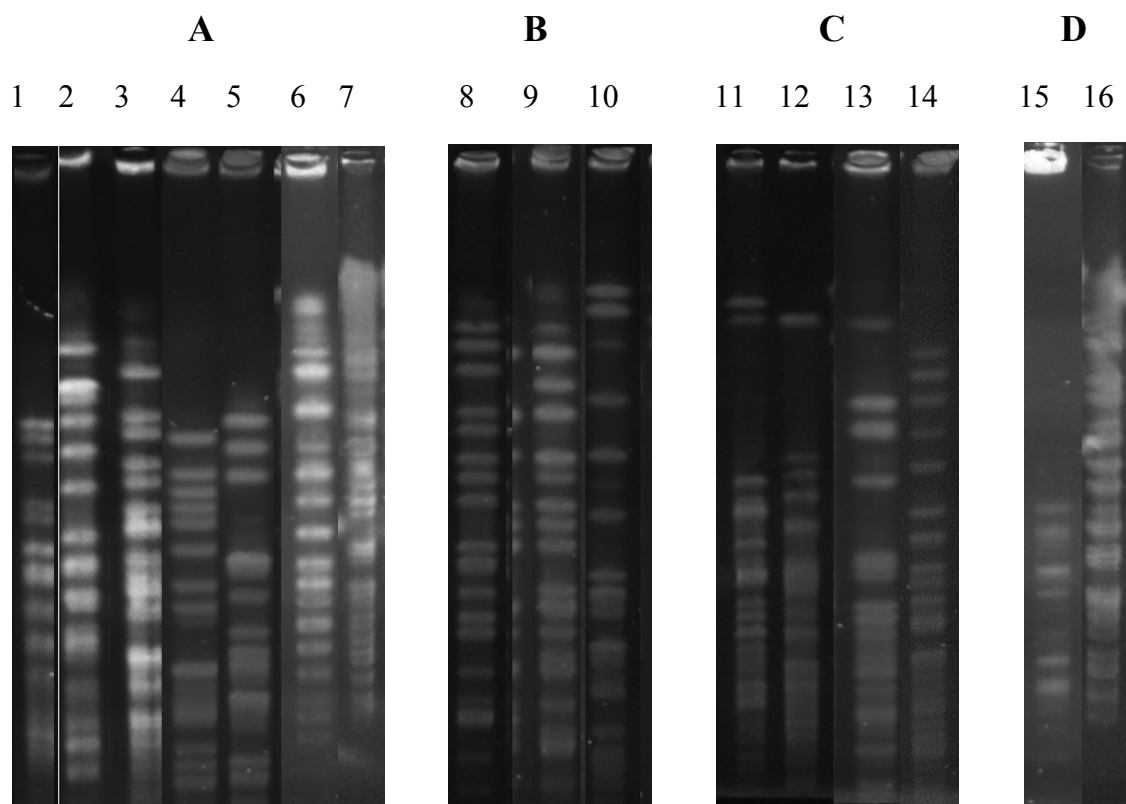


FIGURA 17. SmaI-PFGE degli isolati di *E. thailandicus* ed *E. faecium* (A), *E. hirae* (B), *E. avium* (C), ed *E. gallinarum* (D)

(A): 1, S155; 2, S156; 3, S157; 4, S194; 5, S195; 6, S297; 7, S345

(B) 8, S212; 9, S214; 10, S251

(C) 11, S173; 12, S176; 13, S193; 14, S252

(D) 15, S325; 16, S356

3.3 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni

La trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni è stata studiata attraverso esperimenti di coniugazione su filtro utilizzando come donatori tutti i 31 ceppi che possedevano almeno un determinante di resistenza al linezolid e come riceventi *E. faecium* 64/3 ed *E. faecalis* JH2-2. In particolare, sono stati eseguiti incroci intraspecifici con gli isolati di *E. faecium* ed *E. faecalis* (ad eccezione dei ceppi *S183*, *S297*, *S214*) e interspecifici con gli isolati appartenenti alle altre specie enterococciche. Non tutti i ceppi saggiati si sono dimostrati in grado di trasferire la resistenza al linezolid. Per ciascun incrocio sono stati selezionati e caratterizzati due transconiuganti. In ciascun transconiugante l'acquisizione del gene di resistenza è stata confermata mediante PCR e attraverso la valutazione del fenotipo di resistenza (Tabella 5). I transconiuganti sono stati, inoltre, sottoposti a SmaI-PFGE per confermare il loro background genetico.

Donore/transconiuante	Ricevenente	Frequenza ¹	MIC (mg/L)			Genotipo		
			FFC	CHL	LZD	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxTA</i>
<i>E. faecalis</i> S183	<i>E. faecium</i> 64/3	NR	32	64	2	+	-	-
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.1 x 10 ⁻²						
	TC1		32	64	2	+	-	-
	TC2		32	64	2	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S184	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.6 x 10 ⁻²	64	128	2	+	-	-
	TC3		32	128	4	+	-	-
	TC6		32	128	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S217	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	32	64	2	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S219	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	32	128	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S221	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	32	64	2	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S224	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	64	128	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S232	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	128	128	2	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S338	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	64	64	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S339	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	128	>128	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S340	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	128	>128	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S341	<i>E. faecalis</i> JH2-2	2.5 x 10 ⁻⁷	>128	>128	8	+	-	-
	TC13		32	8	1	+	-	-
	TC14		32	8	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S377	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	32	32	4	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S379	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.4 x 10 ⁻⁴	64	128	4	+	-	-
	TC30		64	32	0.5	+	-	-
	TC31		64	32	0.5	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S380	<i>E. faecalis</i> JH2-2	5.9 x 10 ⁻⁴	64	128	4	+	-	-
	TC32		32	64	0.5	+	-	-
	TC33		32	64	0.5	+	-	-
<i>E. faecalis</i> S381	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.2 x 10 ⁻⁴	128	128	2	+	-	-
	TC34		32	64	0.5	+	-	-
	TC35		32	64	0.5	+	-	-

Donore/transcongiugante	Ricevente	Frequenza	MIC (mg/L)			Genotipo		
			FFC	CHL	LZD	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>
<i>E. faecium</i> S156	<i>E. faecium</i> 64/3	3.5 x 10 ⁻⁴	>128	32	8	-	-	+
1A1			128	32	8	-	-	+
1A2			128	32	8	-	-	+
<i>E. faecium</i> S157	<i>E. faecium</i> 64/3	4.6 x 10 ⁻⁴	>128	32	8	+	-	+
1B1			128	32	8	+	-	+
1B2			128	32	8	+	-	+
<i>E. faecium</i> S194	<i>E. faecium</i> 64/3	3.7 x 10 ⁻⁴	64	16	4	-	-	+
TC21			64	16	4	-	-	+
TC22			64	16	4	-	-	+
<i>E. faecium</i> S195	<i>E. faecium</i> 64/3	7.3 x 10 ⁻²	64	16	2	-	-	+
TC6			64	16	4	-	-	+
TC8			64	16	4	-	-	+
<i>E. faecium</i> S297	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	>128	64	4	+	-	-
	<i>E. faecium</i> 64/3	1.8 x 10 ⁻⁴						
TC36			64	64	2	+	-	-
TC37			64	64	2	+	-	-
<i>E. faecium</i> S345	<i>E. faecium</i> 64/3	1.8 x 10 ⁻³	128	>128	4	+	-	-
TC25			128	64	4	+	-	-
TC27			128	64	4	+	-	-
<i>E. hirae</i> S212	<i>E. faecalis</i> JH2-2	6.3 x 10 ⁻⁸	128	64	8	-	-	+
TC1			128	16	0.5	-	-	-
TC2			128	16	0.5	-	-	-
<i>E. hirae</i> S214	<i>E. faecium</i> 64/3	1.3 x 10 ⁻³	128	32	8	-	-	+
TC9			64	32	8	-	-	+
TC12			64	32	8	-	-	+
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR						

Donore/transcongiugante	Ricevente	Frequenza	MIC (mg/L)			Genotipo		
			FFC	CHL	LZD	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>
<i>E. hirae</i> S251	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	64	16	4	+	+	-
<i>E. avium</i> S173	<i>E. faecalis</i> JH2-2	6.1 x 10 ⁻³	32	32	1	-	+	-
TC1			16	32	1	-	+	-
TC2			16	32	1	-	+	-
<i>E. avium</i> S176	<i>E. faecium</i> 64/3	7 x 10 ⁻⁵	32	16	2	+	+	-
1C1			64	16	4	+	+	-
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.5 x 10 ⁻³						
TC1			64	16	4	+	+	-
TC2			64	16	4	+	+	-
<i>E. avium</i> S193	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.1 x 10 ⁻⁴	16	16	1	+	-	-
TC4			16	32	0.5	+	-	-
TC5			16	32	0.5	+	-	-
<i>E. avium</i> S252	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	32	16	4	+	+	-
<i>E. gallinarum</i> S325	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	64	64	0.5	+	+	-
<i>E. gallinarum</i> S356	<i>E. faecalis</i> JH2-2	NR	>128	64	4	-	-	+
<i>E. thailandicus</i> S155	<i>E. faecium</i> 64/3	NR	>128	>128	4	+	+	-

Tabella 5. Trasferimento coniugativo dei geni di resistenza agli oxazolidinoni a *E. faecalis* JH2-2 ed *E. faecium* 64/3.

¹ La frequenza di trasferimento è stata espressa come CFU di transcongiugante/ricevente. FFC, florfenicolo; CHL, cloramfenicolo; LZD, linezolid.

NR: Frequenza di trasferimento non rilevabile alle condizioni sperimentali utilizzate.

I risultati degli esperimenti di coniugazione riassunti in Tabella 5 indicano che i determinanti di resistenza al linezolid possono essere trasferiti generalmente ad elevata frequenza ai due riceventi enterococcici.

11/24 isolati *optrA*-positivi trasferivano il gene da solo (n=9) o in associazione con *cfr* (n=1) o *poxxA* (n=1) in incroci interspecifici; 7/8 enterococchi *poxxA*-positivi sono stati in grado di trasferire il determinante di resistenza linezolid da solo (n=5) o in associazione con *optrA* (n=1, vedi sopra) ad *E. faecalis* JH2-2 o *E. faecium* 64/3. Gli isolati appartenenti alle specie *E. gallinarum* (n=2) ed *E. thailandicus* (n=1) non sono, invece, risultati in grado di trasferire geni di resistenza a frequenze rilevabili.

3.4 Localizzazione genica

Gli esperimenti di S1-PFGE, Southern blot e ibridazione hanno consentito di chiarire la localizzazione dei determinanti di resistenza nei 31 enterococchi oggetto di questo studio. I geni erano localizzati sia a livello cromosomico che su plasmidi di dimensioni molto variabili e indicativamente comprese tra 30 e 240 kb per quanto riguarda *optrA* (Figura 18), 23 e 97 kb per *cfr*, e 30 e 150 kb per *poxA* (Tabella 6). La localizzazione cromosomica di alcuni determinanti di resistenza potrebbe essere responsabile del loro mancato trasferimento.

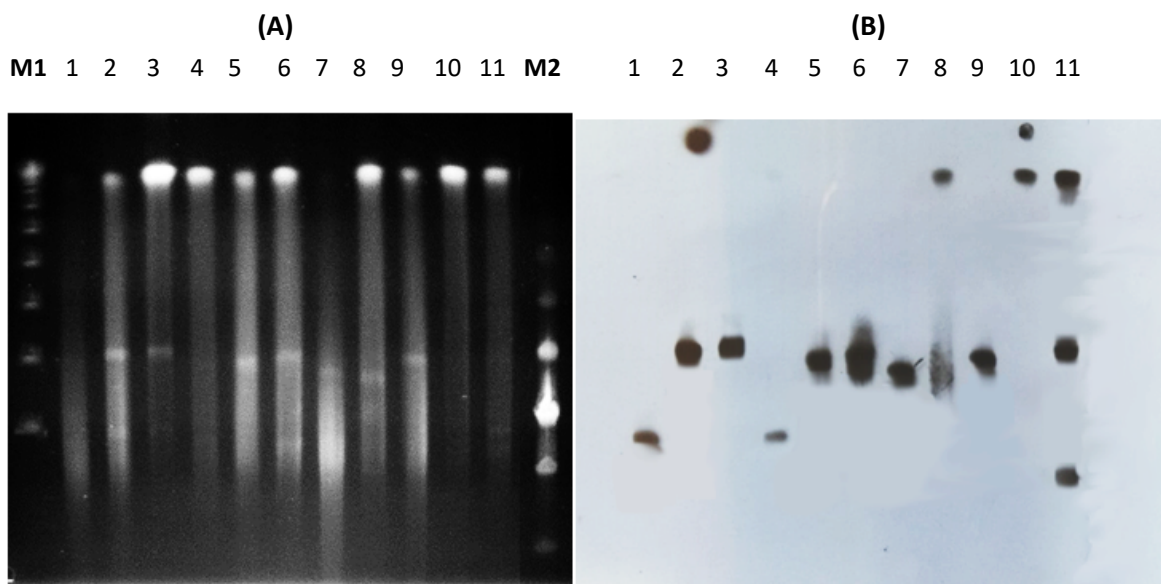


FIGURA 18. S1-PFGE (A) e ibridazione di alcuni ceppi con la sonda specifica per il gene *optrA* (B): 1, S176; 2, S183; 3, S184; 4, S193; 5, S217; 6, S219; 7, S221; 8, S224; 9, S251; 10, S252; 11, S155.

Come marker sono stati utilizzati il Low Range PFG Marker indicato con M2 (New England Biolabs, Ipswich, USA) e il Lambda Marker indicato con M1 (Promega, Madison, USA).

Isolato	Specie	Genotipo			Localizzazione genica		
		<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxA</i>	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxA</i>
S183	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	100 kb	-	-
S184	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	100 kb	-	-
S217	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	90 kb	-	-
S219	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	90 kb	-	-
S221	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	80 kb	-	-
S224	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr	-	-
S232	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr, 96 kb	-	-
S338	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr	-	-
S339	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr	-	-
S340	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr	-	-
S341	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr	-	-
S377	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr, 40 kb	-	-
S379	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr, 70 kb	-	-
S380	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	70 kb	-	-
S381	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	chr, 70, 90 kb	-	-
<hr/>							
S156	<i>E. faecium</i>	-	-	+	-	-	30, 97 kb
S157	<i>E. faecium</i>	+	-	+	chr, 30, 50, 97 kb	-	30, 97 kb
S194	<i>E. faecium</i>	-	-	+	-	-	30, 100 kb
S195	<i>E. faecium</i>	-	-	+	-	-	30, 150 kb
S297	<i>E. faecium</i>	+	-	+	chr, 240 kb	-	-
S345	<i>E. faecium</i>	+	-	-	chr, 45, 150 kb	-	-
<hr/>							
S212	<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	97 kb
S214	<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	30, 100 kb
S251	<i>E. hirae</i>	+	+	-	100 kb	100 kb	-

Isolato	Specie	Genotipo			Localizzazione genica		
		<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>
S173	<i>E. avium</i>	-	+	-	-	48 kb	-
S176	<i>E. avium</i>	+	+	-	48 kb	48 kb	-
S193	<i>E. avium</i>	+	-	-	48 kb	-	-
S252	<i>E. avium</i>	+	+	-	chr	chr	-
S325	<i>E. gallinarum</i>	+	+	-	chr	23 kb	-
S356	<i>E. gallinarum</i>	-	-	+	-	-	chr
S155	<i>E. thailandicus</i>	+	+	-	chr, 25, 100 kb	chr, 48 kb	-

Tabella 6. Localizzazione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni.
chr: localizzazione cromosomica.

4. DISCUSSIONE

La resistenza batterica agli antibiotici è oramai un importante problema di salute pubblica e una delle principali sfide a livello globale. Si stima, infatti, che nel 2050 oltre 10 milioni di decessi saranno causati da batteri MDR. La consapevolezza che le infezioni batteriche non possono più essere curate con i farmaci disponibili è emersa drammaticamente durante l'ultimo decennio e le strategie per combattere questo fenomeno sono nell'agenda dei Governi e sono divenute la "priorità" per le Agenzie nazionali e internazionali coinvolte nella tutela della salute pubblica.

La grave crisi innescata dal diffondere delle antibiotico-resistenze, peraltro esacerbata dalla carenza di nuovi antibiotici, impone di preservare ad ogni costo le risorse ancora in nostro possesso.

Gli oxazolidinoni sono considerati in ambito clinico farmaci "last-resort" in quanto in grado di trattare anche infezioni gravi sostenute da germi MDR.

Il linezolid, primo farmaco di questa classe di antibiotici, mostra ottime caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche e una buona biodisponibilità, ma la sua grande importanza in ambito ospedaliero è riconducibile alla sua capacità di eradicare infezioni severe sostenute da

batteri Gram-positivi MDR, inclusi MRSA, VRE, e pneumococchi, enterococchi e micobatteri MDR (Mendes *et al.*, 2018; Pfaller *et al.*, 2016). Oltre all'efficacia antimicrobica, il trattamento con linezolid offre il vantaggio di una somministrazione per via sia orale che parenterale, ridotti effetti collaterali, ma soprattutto una bassa percentuale di insuccesso terapeutico a causa di resistenze batteriche.

Nel 2014, la FDA approva per uso clinico il tedizolid che, pur condividendo importanti caratteristiche con il linezolid, mostra una maggiore efficacia nei confronti di patogeni MDR, inclusi quelli resistenti al linezolid.

Gli oxazolidinoni sono prodotti di sintesi ma, contrariamente alle aspettative, fenomeni di resistenza si sono manifestati già pochi mesi dopo l'introduzione sul mercato del linezolid (Tsiodras *et al.*, 2001, Gonzales *et al.*, 2001).

Sebbene ad oggi il meccanismo prevalente sia rappresentato da mutazioni ribosomiali, la presenza di geni di resistenza trasferibili (*optrA*, *cfp* e *poxA*) rappresenta un grave pericolo per la loro capacità di diffondere nella popolazione batterica.

Il gene *optrA*, identificato per la prima volta nel 2015, codifica un meccanismo di protezione ribosomiale (Sharkey *et al.*, 2016) e conferisce resistenza ad entrambi gli oxazolidinoni e ai fenicoli. Recenti sorveglianze in

Cina, paese in cui questo determinante è stato originariamente descritto, ne indicano la presenza in isolati sia clinici che animali (Wang *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016); stessa situazione è stata riscontrata anche in molti altri Paesi, inclusa l'Italia (Mendes *et al.*, 2016).

Il gene *cfrr*, che codifica per una metiltrasferasi, è stato descritto prevalentemente in batteri Gram-positivi, ma non mancano segnalazioni in batteri Gram-negativi di origine animale, ambientale e umana (Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). La sua diffusione è riconducibile a diversi fattori quali il suo basso costo in termini di fitness, ma soprattutto la sua co-localizzazione con altri determinanti di antibiotico-resistenza sugli stessi elementi genetici. Quest'ultimo aspetto ha delle implicazioni importanti in quanto, anche in assenza di una pressione selettiva diretta, il gene viene comunque mantenuto e trasferito. Altro fattore cruciale nella diffusione del gene è l'esistenza di una grande varietà di contesti genetici in cui ritroviamo differenti IS (IS1216, ISEnfa4, ISEnfa5, IS256) certamente coinvolte nella mobilità del gene stesso.

Nel 2019 è stato descritto *poxTA*, responsabile della resistenza a fenicoli, oxazolidinoni (incluso il tedizolid) e tetracicline. Il determinante è stato identificato per la prima volta in Italia in un MRSA isolato da una paziente

con fibrosi cistica (Antonelli *et al.*, 18) e immediatamente dopo, ancora in Italia, in un isolato di *E. faecium* di origine suina (Brenciani *et al.*, 2018). *poxTA* mostra un'identità aminoacidica del 32% con *optrA* ed entrambe le proteine appartengono alla famiglia “ATP-Binding-Cassettes” della linea F (ABC-F), prive del dominio transmembrana (Antonelli *et al.*, 2018; Sharkey *et al.*, 2016).

Dalla sua prima segnalazione, *poxTA* è stato descritto in Cina in 19 enterococchi animali (Chang-Wei Lei *et al.*, 2019) e in 66 enterococchi di origine suina (Hao *et al.*, 2019), in Tunisia in 6 enterococchi isolati da carne al dettaglio e da animali da produzione (Elghaieb *et al.*, 2019) e in Spagna in due ceppi di *E. faecium* isolati presso un allevamento suino (Ripa *et al.*, 2019).

La presenza di *poxTA* in enterococchi di origine animale ha suggerito che la selezione di questo gene di resistenza possa aver avuto luogo proprio in ambito animale a causa dell'uso estensivo di fenicoli in medicina veterinaria. In Italia, ad oggi, non sono mai state condotte sorveglianze per monitorare la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in ceppi di origine animale, e ciò nonostante i dati sulle vendite di farmaci veterinari forniti dalla “European Medicines Agency” indicano che nel nostro Paese il consumo di antibiotici è considerevolmente più elevato rispetto ad altri stati europei (EMA, 2018).

Lo scopo principale dello studio è stato quindi quello di dare un quadro, anche se parziale perché limitato alla regione Marche, della situazione italiana riguardo alla presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi di origine suina. Lo studio è stato reso possibile grazie alla preziosa collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche che ha provveduto, nell'ambito delle visite periodiche presso gli 82 allevamenti suinicoli della regione, alla raccolta di pool fecali dai quali sono stati isolati 140 enterococchi florfenicolo-resistenti.

L'analisi genotipica ha evidenziato una situazione veramente preoccupante in quanto il 22,1% (n=31) degli enterococchi florfenicolo-resistenti, possedeva almeno un gene di resistenza al linezolid. Peraltro, non sono emerse differenze significative nell'incidenza della linezolid-resistenza tra gli enterococchi isolati da allevamenti che non avevano fatto uso di florfenicolo e quelli che lo avevano somministrato nell'anno precedente il campionamento. Quest'ultimo dato potrebbe indicare una situazione già ben consolidata, anche negli allevamenti a ciclo chiuso.

Complessivamente *oprA* è risultato essere il gene più diffuso anche se strettamente associato alla specie *E. faecalis* (15/15 isolati *oprA*-positivi).

Nelle altre specie, diverse da *E. faecalis*, anche *poxA* risultava ampiamente presente. Questo dato è particolarmente interessante dal momento che finora

in Italia *poxA* è stato descritto solo in un MRSA clinico e in un enterococco di origine suina.

Altro aspetto preoccupante emerso dallo studio è la propensione di gran parte dei ceppi a trasferire i determinanti di resistenza agli oxazolidinoni a riceventi sensibili e con frequenze complessivamente elevate. Questo dato è in linea con la localizzazione prevalentemente plasmidica dei geni emersa dagli esperimenti di S1-PFGE e ibridazione. Negli enterococchi la resistenza agli antibiotici è, infatti, principalmente associata all'acquisizione di geni di resistenza localizzati su elementi genetici mobili, perlopiù plasmidi coniugativi, che risultano pertanto fondamentali nella diffusione di determinanti di antibiotico-resistenza (Clewell DB *et al.*, 2014; Laverde Gomez *et al.*, 2011) e svolgono un ruolo chiave nell'adattamento ambientale (Clewell DB *et al.*, 2014; Werner *et al.*, 2013).

Nonostante globalmente l'incidenza di ceppi clinici linezolid-resistenti sia ancora piuttosto bassa, desta grave preoccupazione l'esistenza di possibili reservoir di geni di resistenza animali che potrebbero drasticamente compromettere l'efficacia di questi farmaci "last-resort".

È nozione comune che la resistenza agli antibiotici sviluppi più rapidamente a causa di un uso improprio e/o eccessivo di farmaci antimicrobici. Numerosi studi dimostrano che l'uso di antimicrobici negli allevamenti animali porta

all'insorgenza di antibiotico-resistenze e che una riduzione del loro impiego può, in alcuni casi, determinare una riduzione (Torres *et al.*, 2018; Munk *et al.*, 2018).

Il massivo impiego di antibiotici nella cura delle infezioni animali e nella prevenzione della loro diffusione all'interno degli allevamenti, rappresenta di fatto un grave rischio per la salute umana. Determinanti di antibiotico-resistenza possono, infatti, essere facilmente trasferiti da microrganismi di origine animale a batteri umani e questo flusso di geni richiede sorveglianza in entrambi gli ambiti.

Il florfenicolo, mai approvato per uso clinico umano, ma ampiamente utilizzato per prevenire o curare infezioni enteriche e respiratorie negli animali, potrebbe promuovere, grazie a meccanismi di co-selezione, la diffusione non solo dei geni di resistenza ai fenicoli, ma anche dei geni di resistenza al linezolid, con gravissime conseguenze per la salute umana.

Occorre, inoltre, considerare che i fenicoli, dopo essere stati eliminati dagli animali trattati, rimangono attivi nel suolo e in grado di esercitare una pressione selettiva anche sui batteri ambientali (Subbiah *et al.*, 2011). Inoltre, dal momento che *poxA* conferisce resistenza, oltre che a fenicoli e oxazolidinoni, anche alle tetracicline, è verosimile che queste ultime

ampiamente utilizzate in medicina veterinaria, abbiano contribuito in modo sostanziale alla sua diffusione nella popolazione enterococcica animale.

La situazione emersa in questo studio sottolinea ancora una volta quanto pericoloso sia l'utilizzo non razionale di antibiotici in zootecnia e medicina veterinaria. È verosimile che la già preoccupante situazione emersa nei ceppi umani possa rappresentare solo parte di un fenomeno molto più esteso in ambito animale e ambientale. È pertanto essenziale studiare possibili serbatoi animali di geni di resistenza al linezolid che potrebbero entrare nella catena alimentare che porta all'uomo.

In conclusione, la drastica riduzione degli investimenti da parte delle Industrie Farmaceutiche nello sviluppo di nuove molecole antimicrobiche e la sempre più preoccupante diffusione di batteri MDR, impongono un uso ragionevole e consapevole dei farmaci ancora attivi.

Gli enterococchi sono importanti patogeni nosocomiali a livello globale; negli ultimi anni sono state riportate in numero crescente resistenze nei confronti di penicillina/ampicillina, aminoglicosidi e glicopeptidi, con considerevole limitazione delle opzioni terapeutiche. Le alternative nel trattamento delle infezioni da VRE e da enterococchi MDR sono limitate a un numero esiguo di antibiotici “last-resort” tra cui gli oxazolidinoni (Bender *et al.*, 2018).

In considerazione di quanto detto, un nuovo e più prudente approccio alla terapia antibiotica e uno studio accurato dei reservoir animali, saranno essenziali per preservare l'efficacia terapeutica di farmaci "salvavita" come gli oxazolidinoni.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Zhao Q, Wang Y, Wang S *et al.* Prevalence and Abundance of Florfenicol and Linezolid Resistance Genes in Soils Adjacent to Swine Feedlots. *Nature Scientific Reports* 2016; DOI: 10.1038/srep32192.
2. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K *et al.* Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat.* 2018; 40:25-39.
3. Werner G, Coque TM, Franz C, *et al.* Antibiotic resistant enterococci tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303: 360–79.
4. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011; 1241:48-70.
5. Zhanel GG, Love R, Adam H, *et al.* Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs.* 2015; 75(3):253-70.

6. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018; 12 1759–1767.
7. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat*. 2014; 17(1-2):1-12.
8. Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, *et al*. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol. Biol*. 1999; 294(1):93-101. DOI: 10.1006/jmbi.1999.324.
9. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(2):603-12.
10. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L *et al*. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectrum* 2018; DOI:10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
11. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the

- oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(12):5265-5274. DOI: 10.1128/AAC.00871-09.
12. 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(4):1064-73.
 13. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, *et al.* The *Cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(7):2500-5.
 14. Shen J, Wang Y, Schwarz S, *et al.* Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(8):1697-706.
 15. Wang Y, Li D, Song L, *et al.* First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(8):4061-4063. DOI: 10.1128/AAC.00713-13.
 16. Locke JB, Finn J, Hilgers M, *et al.* Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the *cfr* methyltransferase gene or ribosomal

- mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12):5337-5343.
DOI: 10.1128/AAC.00663-10.
17. 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(3):1650-4.
18. 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(1):586-9.
19. Schwarz S, Wang Y. Nomenclature and functionality of the so-called *cfr* gene from *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(4):2476-7.
20. 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(10):6256-61.
21. 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; 72(6):1581-1588.

22. 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(8):2182-90.
23. Mendes RE, Hogan PA, Jones RN, *et al.* Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): evolving resistance mechanisms with stable susceptibility rates. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(7):1860-1865. DOI: 10.1093/jac/dkw052.
24. 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.
25. Ero R, Kumar V *et al.* Ribosome protection by ABC-F proteins Molecular mechanism and potential drug design. *Protein Science.* 2019; DOI: 10.1002/pro.3589.
26. 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(4): 1118-1129.

27. Morroni G, Brenciani A, Simoni S. Commentary: Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene *optrA* in Enterococcus isolates in China from 2004 to 2014. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1631.
28. Li D, Wang Y, Schwarz S, *et al.* Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfrr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(6):1474-8.
29. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(9):2530-2533. DOI: 10.1128/AAC.44.9.2530-2533.2000.
30. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM, *et al.* Novel multiresistance *cfrr* plasmids in linezolid-resistant methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfrr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(12):3252-3257.
31. 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(6):1466-73.

32. Papagiannitsis C, Tsilipounidaki K, *et al.* Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxxA*. *J Antimicrob Chemother.* 2019; DOI:10.1093/jac/dkz155.
33. Elghaieb H, Freitas AR, *et al.* Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxxA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* 2019; DOI:10.1093/jac/dkz263.
34. Kang ZZ, Lei CW, *et al.* Detection of transferable oxazolidinone resistance determinants in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of swine origin in Sichuan Province, China. *Glob Antimicrob Resist.* 2019; DOI:10.1016/j.gar.2019.05.021.
35. 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.
36. D'Andrea MM, *et al.* Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying *poxxA*, *cfp* and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019; DOI:10.1093/jac/dkz278.

37. Hille K, Ruddat I, Schmid A, *et al.* Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms-Joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. *Preventive Veterinary Medicine*, 2017; 142: 39-45.
38. Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, *et al.* SmaI macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist.* 2001; 7(1):65-71.
39. 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.
40. Pfaller MA, Flamm RK, Jones RN, *et al.* Activities of Tedizolid and Linezolid Determined by the Reference Broth Microdilution Method against Gram-Positive Bacterial Isolates Collected in Asia-Pacific, Eastern Europe, and Latin American Countries in 2014. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2016; 60(9):5393-5399. DOI: 10.1128/AAC.00881-16.

41. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 358(9277):207-8.
42. Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, *et al.* Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*. 2001; 357(9263):1179.
43. Sharkey LK, Edwards TA, O'Neill AJ, *et al.* ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio*. 2016; 7(2): e01975-15.
44. Cai JC, Hu YY, Zhou HW, *et al.* Dissemination of the same *cfr*-carrying plasmid among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates in China. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015; 59(6):3669-71.
45. Brenciani A, Fioriti S, *et al.* Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxA*. *J Antimicrob. Chemother*. 2018. 74: 817–818. DOI:10.1093/jac/dky505.
46. Lei CW, Kang ZZ, *et al.* Detection of the phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene *poxA* in *Enterococcus faecium* and

- Enterococcus faecalis* of foodproducing animal origin in China. *J Antimicrob. Chemother.* 2019. DOI: 10.1093/jac/dkz198.
47. Hao W, Shan X, *et al.* Analysis of a *poxA*- and *optrA*-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob. Chemother.* 2019. DOI: 10.1093/jac/dkz109.
48. Ripa RL, *et al.* Detection of *poxA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. *Glob Antimicrob Resist.* 2019. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.12.012.
49. EMA. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 30 European Countries in 2016. *Veterinary Medicines Division.* 2018.
50. Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, *et al.* Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. In: Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y. *et al.*, eds. *Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014; 309–420.
51. Laverde Gomez JA, Hendrickx APA, Willems RJ, *et al.* Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *PLoS One.* 2011; 6: e16720.

52. Werner G, Coque TM, Franz C, *et al.* Antibiotic resistant enterococci—tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303: 360–79.
53. Munk P, Knudsen BE, *et al.* Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microb.* 2018. 3, 898–908.
54. Subbiah M, Mitchell SM, Ullman JL *et al.* b-Lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 7255–7260. DOI: 10.1128/AEM.05352-11.
55. Bender KJ, Cattoir V, *et al.* Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Update.* 2018. DOI: 10.1016/j.drug.2018.10.002.

Ringraziamenti

Con questa tesi giunge ormai al termine il mio percorso universitario. Non è stato facile raggiungere il traguardo e per questo vorrei ringraziare, in poche righe, le persone che molto pazientemente mi hanno accompagnata in questo cammino.

Un ringraziamento particolare va alla mia Relatrice, la Prof.ssa *Eleonora Giovanetti*, per avermi dato la possibilità di entrare in laboratorio appassionandomi sempre più al bellissimo mondo della microbiologia e per la gentilezza, la disponibilità e l'aiuto fornito durante tutto il percorso di tesi.

Al Dott. *Andrea Brenciani* e la dottoranda *Simona Fioriti*, che con tantissima pazienza mi ha affiancato e insegnato giorno dopo giorno a stare in laboratorio.

Ringrazio la mia famiglia, mia sorella *Gessica* e in particolar modo i *miei genitori* perché senza i loro sacrifici non avrei mai avuto la possibilità di intraprendere il percorso universitario. Dedico a loro questo traguardo sperando che, almeno in parte, possa ripagare quello che in questi anni hanno fatto per me.

Al mio *Giampiero* che, oltre ad essere un punto fermo nella mia vita, ha sempre creduto in me e mi ha accompagnato, supportata e sopportata in tutti questi anni tra alti e bassi.

Alle mie amiche d'infanzia, *Simona* e *Valeria*, a cui voglio un gran bene e che nonostante le diverse scelte di vita e la distanza non mi hanno mai lasciata sola e sono certa che mai lo faranno.

Altro grazie va a *Luca* conosciuto solo negli ultimi anni ma che ha reso migliore la fine di questo percorso, un vero amico anche al di fuori dell'università.

Alle mie coinquiline ed in particolar modo a *Sara*, con cui ho condiviso anni di convivenza tra momenti seri e momenti meno seri che porterò sempre con me anche dopo questo percorso.

E poi un pensiero va lassù, a *TE zia*, che nonostante non sei più con noi non c'è giorno in cui non ti abbia pensata. So che saresti stata felice di me e per me.