



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**Trasferibilità di geni di antibiotico-resistenza in  
enterococchi isolati dall'ambiente marino mediante  
coniugazione *in vitro* e *in vivo***

**Transferability of antibiotic resistance genes  
by *in vitro* and *in vivo* conjugation assays in  
enterococci from marine environment**

Tesi di Laurea Magistrale  
di: Alice Borgognoni

Relatore Chiar.ma  
Prof.ssa Carla Vignaroli

Correlatore:  
Dott.ssa Serena Simoni

Sessione Straordinaria  
Anno Accademico 2020/2021

<b>INDICE</b>	<b>Pagine</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>4</b>
1.1. Antibiotico resistenza.....	4
1.1.1. Antibiotico resistenza nell'ambiente .....	7
1.2. Contaminazione fecale delle acque.....	13
1.3. Ceppi indicatori fecali.....	17
1.3.1. <i>Enterococcus spp.</i> .....	17
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....	21
1.4. Trasferimento genico orizzontale (HGT) .....	23
1.4.1. Coniugazione batterica.....	24
1.5. I mitili.....	30
<b>2. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>34</b>
3.1. Ceppi batterici utilizzati.....	34
3.2. Terreni di coltura e antibiotici .....	40
3.3. Saggi di Coniugazione <i>in vitro</i> .....	44
3.4. Fase di depurazione delle cozze.....	46
3.5. Saggi di Bioaccumulo e Coniugazione <i>in vivo</i> .....	49
3.6. Determinazione della MIC.....	51
3.7. Estrazione del DNA totale batterico .....	52
3.8. Saggi di PCR.....	53

3.9.	PFGE.....	57
<b>4.</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>59</b>
4.1.	Identificazione degli enterococchi resistenti al florfenicolo e ricerca dei geni di resistenza .....	59
4.2.	Identificazione degli enterococchi resistenti alla vancomicina e ricerca dei geni di resistenza .....	61
4.3.	Coniugazioni <i>in vitro</i> .....	64
4.4.	Bioaccumulo e Coniugazione <i>in vivo</i> .....	65
4.4.1.	Bioaccumulo .....	65
4.4.2.	Sopravvivenza batterica in acqua .....	69
4.4.3.	Saggi di coniugazione <i>in vivo</i> : rapporto donatore/ricevente ....	70
4.4.4.	Saggi di coniugazione <i>in vivo</i> : ceppi diversi .....	74
4.4.5.	Bioaccumulo e Saggi di coniugazione <i>in vivo</i> condotti a differenti temperature.....	75
4.4.6.	Efficienza di coniugazione.....	77
4.5.	Analisi genotipica e fenotipica dei ceppi transconiuganti .....	79
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>FONTI DELLE IMMAGINI .....</b>	<b>98</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Antibiotico resistenza

La resistenza agli antibiotici è stata descritta come una delle maggiori minacce globali del XXI secolo. Nuovi determinanti di resistenza possono emergere ovunque e in qualsiasi momento. L'incredibile numero di cellule batteriche sulla Terra, stimato intorno a  $10^{30}$ , cioè mille miliardi di miliardi di miliardi (Kallmeyer et al. 2012), fornisce un'immensa variabilità genetica, infinite opportunità di mutazioni, e trasferimento genico orizzontale (Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson and D. G. Joakim Larsson, 2018). L'era antibiotica ha avuto un profondo impatto positivo sulla gestione delle malattie infettive, permettendo la cura di numerose infezioni, precedentemente spesso letali. Tuttavia, in poco tempo dalle prime applicazioni, sono emersi casi sempre più frequenti di infezioni che non rispondono più al trattamento terapeutico, evidenziando così il problema dell'antibiotico resistenza. A differenza di qualsiasi altra classe di farmaci utilizzati, gli antibiotici agiscono sul microrganismo, agente eziologico della malattia, piuttosto che solo sul paziente. Un ceppo microbico si può definire resistente, nel momento in cui è in grado di crescere o sopravvivere in presenza di una determinata concentrazione di antibiotico, che solitamente è sufficiente ad inibire o uccidere organismi della stessa specie. Purtroppo, l'uso di questi antibatterici è stato accompagnato quindi dalla rapida comparsa di ceppi resistenti (Liu, B., & Pop, M., 2009). Si tratta di un passaggio naturale del processo evolutivo, legato a caratteristiche genetiche, strutturali o fisiologiche di un microrganismo che vengono ereditate da tutta la progenie. Questo fenomeno può essere naturalmente presente in alcune specie batteriche, considerate "intrinsecamente

resistenti”, le cui caratteristiche impediscono a prescindere l’azione del farmaco (ad esempio a causa dell’assenza del target biologico dell’antibiotico stesso); oppure si parla di “resistenza acquisita”, quando un ceppo batterico precedentemente sensibile ad un determinato antibiotico sviluppa un fenotipo resistente, comportando l’uso di concentrazioni maggiori di antibiotico o di combinazioni di farmaci diversi per eradicare la malattia di cui è responsabile. Le cause possono essere distinte in:

- **Endogene (o cromosomiche)**, che sono basate su mutazioni genetiche che possono portare alla modifica del target, o alla sovra espressione di meccanismi cellulari necessari per lo sviluppo della resistenza.
- **Esogene (o extracromosomiche)**, che derivano dall’acquisizione di determinanti genetici di resistenza dall’ambiente esterno, mediante il fenomeno del trasferimento genico orizzontale (HGT). Questo comprende la coniugazione (acquisizione di elementi genetici da un’altra cellula batterica), la trasformazione (assunzione dall’ambiente extracellulare di molecole di DNA provenienti da cellule lisate) e la trasduzione (per mezzo di batteriofagi) (Heroven, A. K., Nuss, A. M., & Dersch, P., 2017).

I microorganismi che acquisiscono i determinanti di resistenza dall’esterno sviluppano un fenotipo che possono poi trasferire alla progenie (Courvalin, P. 2008). Se da un lato lo sviluppo di antibiotici ha rappresentato un importante successo sanitario, sfortunatamente dall’altro, l’enorme utilizzo ed abuso ha portato all’insorgere di nuove problematiche. Successivamente alla loro introduzione, infatti, milioni di tonnellate di antibiotici sono state prodotte ed impiegate per un’ampia varietà di applicazioni. L’eccessivo accumulo di queste sostanze nell’ambiente ha ovviamente contribuito in modo significativo

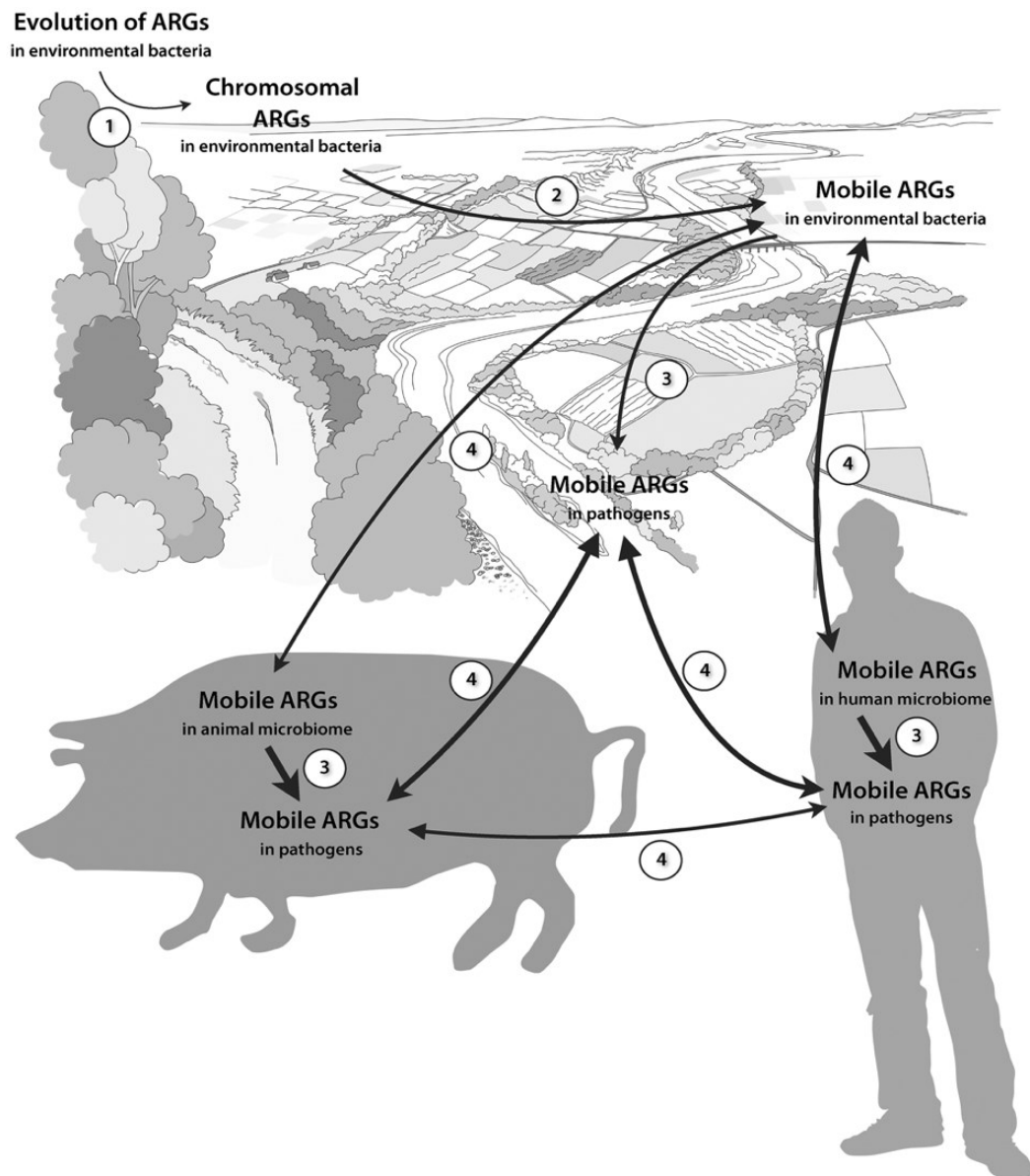
alla selezione di ceppi multi-resistenti (MDR), associati a patologie umane di difficile eradicazione. Questo ha avuto un forte impatto economico nella società moderna, in termini di aumento della mortalità, morbilità e consumo di risorse sanitarie. Cosa ancora più preoccupante è la grave mancanza di sviluppo di nuovi antibiotici. Precisamente, negli ultimi 25 anni, solo due nuove classi di antibiotici sono stati sviluppati e introdotti in pratica clinica. Questi includono gli ossazolidinoni (es. linezolid) e i lipopeptidi (es. daptomicina). Molti altri antibiotici più recenti sono molecole modificate di farmaci già esistenti, piuttosto che classi innovative (Davies, J., & Davies, D. 2010). Oltre agli ovvi rischi per la salute associati all'aumento di geni di resistenza tra i patogeni umani, ci sono ulteriori circostanze preoccupanti che suggeriscono che il futuro sarà ancora più oscuro, caratterizzato proprio dal diffondersi di batteri multi-resistenti. I determinanti di resistenza a basso costo, in termini di *fitness*, tendono ad essere mantenuti e possono evolvere in risposta a varianti più efficienti dello stesso antibiotico. Inoltre, i geni di resistenza, ad antibiotici diversi, possono co-localizzarsi sullo stesso elemento genetico mobile; pertanto, in futuro, ci si potrebbe aspettare di vedere un rapido aumento di batteri multi-resistenti, per il fatto che l'esposizione agli antibiotici incrementa le frequenze di mutazione e ricombinazione e la selezione di co-resistenze. Se tali riorganizzazioni genetiche si uniscono ad un tasso di mutazione aumentato, il risultato netto sarebbe un'evoluzione ancora più rapida verso geni di resistenza mobili con costi di fitness inferiori. Tutto questo consentirà ai batteri di adattarsi più rapidamente a nuove nicchie ecologiche. I geni candidati per una futura mobilitazione, probabilmente, non si limiterebbero a conferire resistenza agli antibiotici, ma potrebbero fornire anche un vantaggio in termini di adattamento ai cambiamenti ambientali. Sopravvivere a condizioni abiotiche altamente variabili, manipolare sostanze tossiche, utilizzare nuove fonti di

carbonio, competere con altri microbi, aderire a diversi tipi di superfici, e consentire la formazione di spore altamente durevoli sono solo alcuni degli ipotetici benefici. Tutto questo prospetta un futuro molto complicato in cui i patogeni umani non solo non sarebbero più sensibili alla maggior parte degli antibiotici in uso, ma diventerebbero anche più aggressivi e si diffonderebbero più facilmente tra gli esseri umani. È quindi fondamentale comprendere non solo i rischi per la trasmissione della resistenza, ma anche le conseguenze evolutive della contaminazione degli ambienti naturali da parte di antibiotici, batteri antibiotico-resistenti e geni di resistenza (Johan Bengtsson-Palme Erik Kristiansson and D. G. Joakim Larsson, 2018).

### **1.1.1. Antibiotico resistenza nell'ambiente**

La maggioranza degli antibiotici attualmente utilizzati per il trattamento delle infezioni ed i corrispondenti geni di resistenza sembrano avere un'origine ambientale, in quanto le sostanze con attività antimicrobica sono prodotte principalmente da microrganismi presenti nell'ambiente naturale, soprattutto il suolo. Il che significa che anche i determinanti di resistenza sono emersi non solo in ambito clinico. Una migliore comprensione del ruolo ecologico degli antibiotici in habitat non clinici può aiutare a prevedere e contrastare l'emergere e l'evoluzione futura delle resistenze (José L. Martínez, 2008). La mobilitazione di un gene di resistenza potrebbe avvenire ovunque, ma necessita di una pressione selettiva tale da consentire la sua stabilità nel genoma batterico quando si raggiungono costi di fitness inferiori. È quindi ragionevole presumere che, una volta che un gene di resistenza mobile insorge in una comunità batterica, il gene venga mantenuto se il costo di *fitness* risulta ridotto. Pertanto, questi processi di selezione naturale contribuiscono a preservare un

pool ambientale di geni di resistenza. Si può parlare quindi di ecologia dello sviluppo della resistenza agli antibiotici, evidenziando quattro passaggi clinicamente importanti: comparsa di nuovi fattori di resistenza in batteri ambientali, mobilizzazione, disseminazione nel microbioma umano e animale, trasferimento a patogeni umani e animali. Non è necessario un particolare ordine, ma è cruciale il fatto che il gene di resistenza raggiunga i patogeni umani, mantenendosi lungo una di queste vie (**Figura 1**).

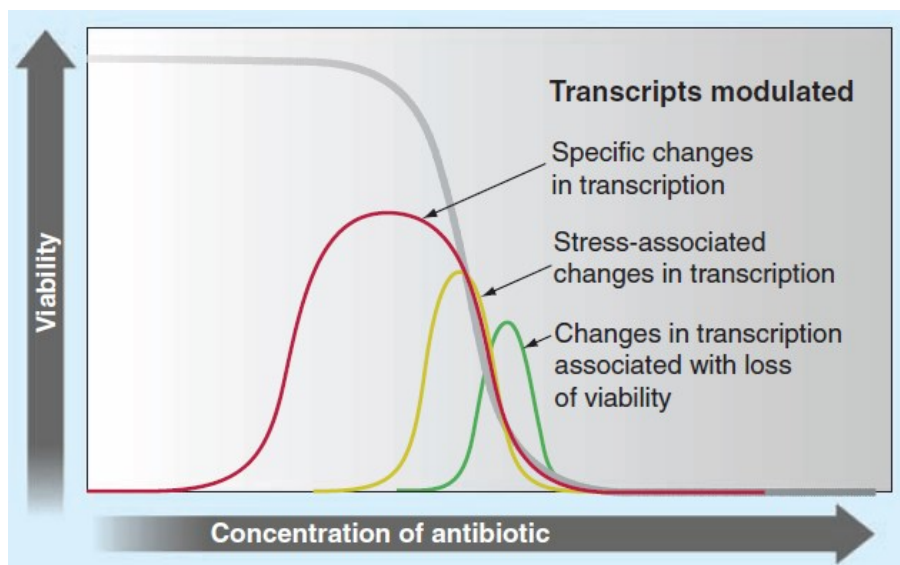




*Figura 1; le fasi principali del ruolo dell'ambiente nel reclutamento di geni di resistenza agli antibiotici (ARG) per i patogeni umani. La larghezza di ciascuna freccia corrisponde approssimativamente alla frequenza presunta di ciascun evento. Si noti che, a causa del numero maggiore di batteri ambientali rispetto a quelli associati all'uomo e agli animali, il focus di questa figura è sui processi che coinvolgono l'ambiente come serbatoio di geni di resistenza per i batteri patogeni.*

La mitigazione della diffusione di questi fattori di resistenza ai patogeni dovrebbe avvenire idealmente prima che prendano piede nel microbiota umano. Pertanto, il rilevamento nell'ambiente di geni di resistenza, che non sono ancora diffusi tra i batteri clinici, rappresenta una componente fondamentale nella valutazione del rischio e nella gestione delle antibiotico-resistenze (Johan Bengtsson-Palme Erik Kristiansson and D. G. Joakim Larsson, 2018). La caratteristica più sorprendente del microbioma ambientale è la sua immensa diversità; fornisce numerosi geni che potenzialmente potrebbero essere acquisiti e utilizzati dai patogeni per contrastare l'effetto degli antibiotici. Per tutte le classi di antibiotici approvate finora in medicina, siano essi naturali, semisintetici o sintetici, è stata riscontrata resistenza nei loro confronti in almeno uno dei patogeni che prendono di mira. Questo suggerisce che gli habitat naturali già ospitano fattori di resistenza per tutti gli antibiotici che saranno mai sviluppati in futuro, a meno che non si inizi a progettare gli antibiotici in modo radicalmente diverso. Di solito, inizialmente da un gene di antibiotico-resistenza (ARG) cromosomico, immobile, c'è tipicamente un'evoluzione graduale che porta alla diffusione della resistenza. Il primo passo solitamente è la capacità di un ARG di muoversi all'interno dello stesso genoma, per poi trasferirsi ad un elemento genico, che può spostarsi autonomamente tra cellule diverse. Il terzo passo è quindi il trasferimento genico orizzontale di un gene di resistenza diventato mobile. Mentre il quarto, che può verificarsi in qualsiasi momento del processo, è la diffusione del

batterio che porta l'ARG ad un essere umano o ad un animale, un'abilità descritta dal termine “connettività ecologica” (D. G. Joakim Larsson and Carl-Fredrik Flach, 2021). Poiché qualsiasi entità chimica potrebbe diventare tossica a concentrazioni eccessivamente alte, sembra plausibile che le molecole selezionate dalle aziende farmaceutiche abbiano distinte funzioni a concentrazioni terapeutiche, rispetto a quelle più basse probabilmente incontrate in natura (**Figura 2**). Infatti, basse concentrazioni di antibiotici innescano modifiche trascrizionali specifiche, che addirittura, possono avere conseguenze benefiche per i batteri, modulando le interazioni all'interno delle comunità microbiche. Questa peculiare capacità di risposta ha ulteriori implicazioni cliniche, in quanto concentrazioni sub-inibitorie potrebbero addirittura favorire la virulenza dei batteri in determinate condizioni.



**Figura 2;** *Effetto degli antibiotici sull'espressione genica batterica. Gli antibiotici innescano nei batteri cambiamenti di tipo trascrizionale che possono essere concentrazione-dipendenti.*

L'enorme numero di geni di resistenza agli antibiotici trovato nell'ambiente solleva l'ovvia domanda sul perché così tanti geni si siano evoluti. Senza dubbio, l'utilizzo di sostanze con attività antibiotica come fonte di nutrienti da parte delle popolazioni microbiche naturali potrebbe aver portato

ad elevati livelli di resistenza. Allo stesso modo, sembra chiaro che i microrganismi produttori possiedano determinanti di resistenza, che li rendono insensibili all'azione degli antibiotici che loro stessi producono. Meno ovvio il perché i batteri non produttori di antibiotici possiedano molteplici geni di resistenza. Sorprende, quindi, che sebbene ci sia una notevole preoccupazione per il potenziale effetto dei determinanti di resistenza, il ruolo che l'ambiente può avere sulla popolazione dei batteri ha ricevuto molta meno attenzione. È interessante, perciò, approfondire se e in che modo i cambiamenti antropogenici dell'ambiente possano arricchire le popolazioni di batteri naturali e facilitare il trasferimento di geni di resistenza ad agenti patogeni dell'uomo. Attualmente, il rilascio antropico di antibiotici nell'ambiente ha sollevato molte preoccupazioni per la salute pubblica in quanto, sono ampiamente utilizzati, non solo in medicina per il trattamento delle infezioni umane, ma anche in agricoltura e nell'allevamento di animali, con possibilità che elevate quantità di tali composti si possano riscontrare negli habitat naturali. Il sovra utilizzo e/o l'utilizzo errato di questi farmaci hanno determinato lo sviluppo di resistenze specifiche nelle comunità batteriche e la loro diffusione nell'ambiente esterno, tramite molteplici vie di contaminazione correlate ad attività antropiche (agricoltura intensiva, distretti industriali, impianti zootecnici intensivi, acquacoltura, scarichi fognari urbani ed ospedalieri) (José L. Martínez, 2008). L'inquinamento microbiologico dell'ambiente marino è un aspetto fondamentale per valutare la qualità delle acque, che se contaminate possono rivelarsi un preoccupante serbatoio di agenti patogeni. Negli ambienti acquatici, si possono infatti distinguere i microrganismi indicatori (coliformi totali e fecali, enterococchi, *Escherichia coli*) dai patogeni enterici (*Salmonella spp.*, *Vibrio spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterovirus spp.*). Gli enterococchi in particolare, si ritrovano ovunque a livello ambientale, grazie alla capacità di

adattarsi a condizioni ambientali molto variabili e potenzialmente sfavorevoli di temperatura, pH, ossigenazione, concentrazione di sali e ioni metallici. Sono presenti nell'ambiente circostante in grandi quantità, occupando suolo, alimenti di origine animale, vegetale ed acqua. Nonostante siano batteri commensali dell'uomo e degli animali, è importante sottolineare che sono anche tra i principali agenti di infezioni nosocomiali nel mondo. Questi batteri intestinali, secondo studi epidemiologici internazionali, sono stati riconosciuti dall'EPA come il miglior indicatore per il monitoraggio della qualità microbiologica delle acque (USEPA, 2012). Quando è stata segnalata per la prima volta l'esistenza degli indicatori fecali ambientali, gli studi erano limitati alle aree tropicali per via delle temperature più elevate che potevano loro facilitare la sopravvivenza e replicazione. Tuttavia, ulteriori studi hanno evidenziato la stessa presenza di batteri indicatori nelle aree subtropicali e temperate. Secondo i criteri di qualità delle acque ambientali (USEPA 1986) della US Environmental Protection Agency (USEPA), gli enterococchi, ed anche *Escherichia coli* sono stati stabiliti come indicatori fecali per il monitoraggio delle acque, e più recentemente, sono stati proposti anche per il controllo degli alimenti di origine animale. Si è visto come l'ambiente può fornire un percorso articolato per alcuni batteri antibiotico-resistenti permettendo loro di colonizzare o infettare gli ospiti. Esiste una vasta letteratura su come alcuni batteri possono diffondersi attraverso il cibo, la contaminazione di superfici, e non ultimo negli ospedali. Fattori ambientali abiotici, come temperatura, pressione, nutrienti, o biotici (predazione e competizione con altre specie), hanno un ruolo molto importante sia nell'evoluzione che nella trasmissione di geni di resistenza, forse più di quanto sia stato generalmente riconosciuto. La priorità nel contrastare la diffusione dell'antibiotico-resistenza dovrebbe idealmente essere globale, poiché le conseguenze influenzeranno tutti a lungo

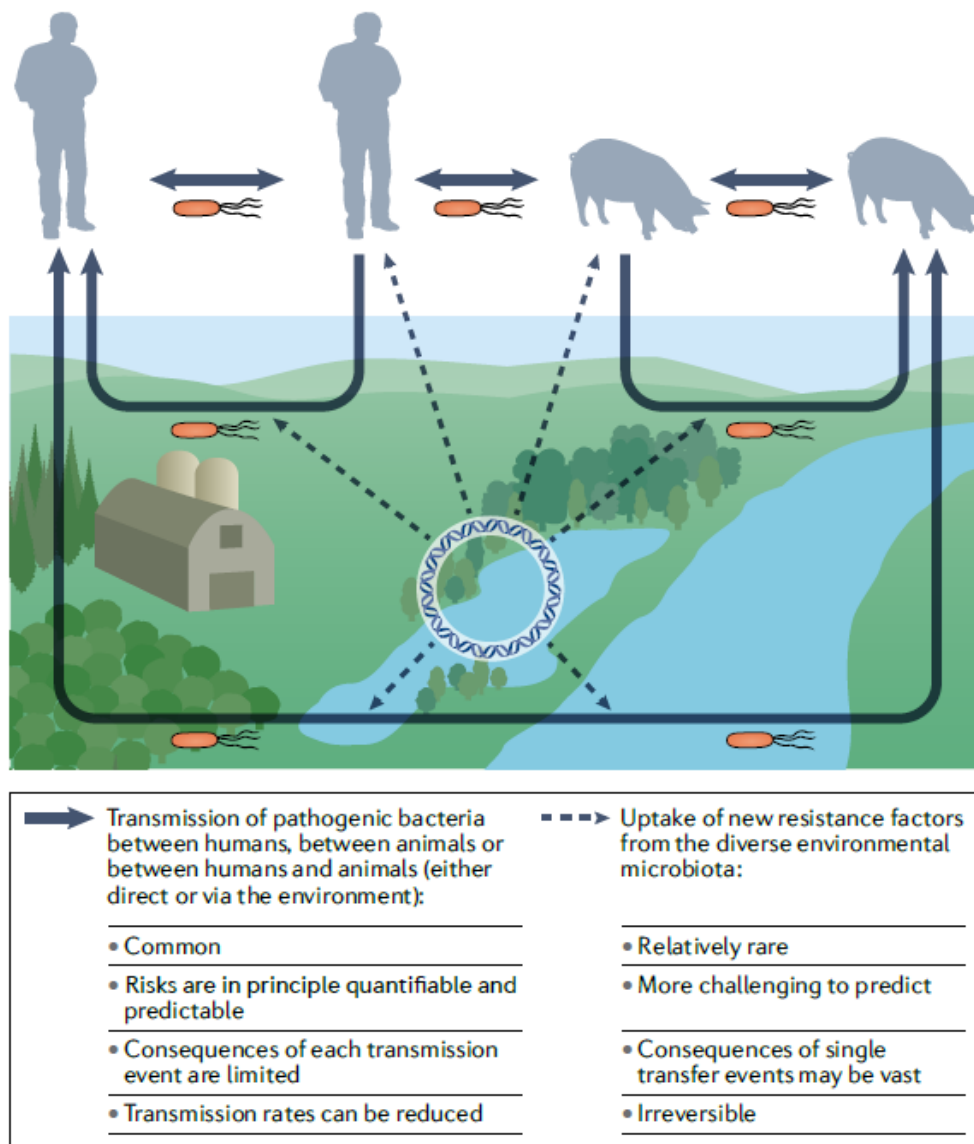
termine, indipendentemente da dove sia emersa una resistenza. Un potenziale punto di partenza è sicuramente quello di limitare radicalmente il loro utilizzo, riservandolo solo a situazioni in cui è strettamente necessario e ridurre il rilascio nell'ambiente sia di alte concentrazioni di antibiotici che di batteri antibiotico-resistenti (D. G. Joakim Larsson and Carl-Fredrik Flach, 2021).

## **1.2. Contaminazione fecale delle acque**

La valutazione della qualità microbiologica dell'acqua viene storicamente effettuata mediante la ricerca di microrganismi indicatori. In particolare, *Escherichia coli* ed *Enterococcus spp.* sono considerati indicatori batterici fecali, utilizzati per il controllo della qualità delle acque. L'obiettivo è quello di valutare la carica di questi batteri nei campioni per valutare il grado di contaminazione fecale. Tuttavia, nel monitoraggio delle acque, la ricerca di possibili ceppi resistenti alle classi di antibiotici maggiormente usati per l'eradicazione dei ceppi patogeni non viene effettuata. Anche il possibile ruolo dell'ambiente marino nel trasferimento dei geni di resistenza e come potenziale serbatoio di resistenza agli antibiotici è sottovalutato (Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque BRIANCESCO Dipartimento di Ambiente, Istituto Superiore di Sanità, Roma 2005). Nell'ampio spettro di patologie umane trasmesse attraverso l'acqua alcune sono da attribuire a microrganismi autoctoni dell'ambiente acquatico, altre, in numero prevalente, sono dovute ad agenti patogeni derivanti dal tratto gastrointestinale degli animali e dell'uomo, pervenuti nell'ambiente acquatico in seguito ad episodi di contaminazione fecale. In quest'ultimo caso, la concentrazione dei microrganismi patogeni nell'ambiente dipende dal numero di persone infette e di portatori asintomatici presenti nella comunità, dall'efficacia dei sistemi di

trattamento delle acque e dalla capacità di autodepurazione dei corpi idrici recettori. Poiché le metodiche di rilevamento e di quantificazione nell'ambiente acquatico dei diversi microrganismi patogeni sono spesso molto articolate, costose, e peraltro non disponibili per tutti i microrganismi, la valutazione della qualità microbiologica dell'acqua si basa sulla definizione e sulla ricerca di organismi indicatori per i quali vengono fissati opportuni valori guida. Un organismo, per essere un indicatore, deve soddisfare molteplici requisiti, tra cui i principali: essere presente nell'acqua quando sono presenti anche i microrganismi patogeni, avere una concentrazione che sia correlata al grado di contaminazione fecale, non essere patogeno, non mutare nel tempo, non essere in grado di moltiplicarsi nell'acqua, ed essere rilevabile con metodi semplici, accurati, rapidi ed economici. Il ricorso all'uso di organismi indicatori non consente una stima diretta della presenza di un determinato microrganismo patogeno nell'ambiente idrico; permette, piuttosto, la valutazione della probabilità che siano presenti patogeni enterici. Infatti, non esiste un indicatore capace di segnalare tutti i patogeni, anche nel circoscritto ambito dell'inquinamento fecale. In questi ultimi anni, sono stati evidenziati alcuni limiti nell'impiego dei coliformi come indicatori di contaminazione fecale delle acque e si è delineata la necessità di sostituire il parametro coliformi fecali con *Escherichia coli*. Infatti, considerata l'elevata rappresentanza della specie nel gruppo dei coliformi fecali (90%), nonché l'esclusivo rapporto del microrganismo con il tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, tenuto anche conto del loro spiccato potenziale di sopravvivenza nell'ambiente, *Escherichia coli* meglio assolve il ruolo di indicatore. La ricerca degli enterococchi come parametro, invece, è attualmente prevista dal DL. n. 31/01 relativo alle acque destinate al consumo umano, dal DL. n. 152/99 relativo alla classificazione delle acque marino-costiere, e dalle varie proposte

di direttiva per la revisione della normativa sulle acque di balneazione. Gli enterococchi includono tutte le specie appartenenti al genere *Enterococcus* che sono in grado di crescere a 10°C e a 45°C, a pH 9.6, in presenza di NaCl al 6,5%, che resistono a 60°C per 30 minuti e che sono in grado di ridurre il blu di metilene allo 0,1% (Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque BRIANCESCO Dipartimento di Ambiente, Istituto Superiore di Sanità, Roma 2005). Il rilascio ambientale di microrganismi fecali può quindi favorire il contatto e lo scambio di geni tra batteri ambientali e batteri del tratto intestinale e poiché si ritiene che l'ambiente sia un serbatoio genetico considerevolmente grande, la fonte di nuovi geni di resistenza potrebbero essere proprio i batteri ambientali. Molti batteri intestinali inoltre portano elementi genetici mobili (plasmidi, elementi coniugativi, sequenze d'inserzione, trasposoni o integroni) che possono facilitare l'acquisizione di geni e il loro trasferimento a batteri patogeni. Infine, non è da sottovalutare la presenza di ARG anche nei batteri commensali fecali che una volta introdotti nell'ambiente potrebbero essere coinvolti nei processi evolutivi che portano all'emergere di nuove forme di resistenza nei batteri di rilevanza clinica. Quanto siano comuni i diversi scenari rappresentati è ancora in gran parte sconosciuto. Tuttavia, la probabilità di scambi genetici è molto più alta nel microbiota umano e in quello degli animali domestici dove è più comune che commensali e patogeni possano venire a contatto.



*Figura 3; vie di trasmissione di patogeni batterici e acquisizione di geni di resistenza dal microbiota ambientale.*

Le vie principali di trasmissione di patogeni resistenti all'uomo (**Figura 3**), sono rappresentate soprattutto dal contatto diretto o indiretto con altri individui o con animali domestici malati. La trasmissione indiretta, nella maggior parte dei casi è correlata alla contaminazione fecale dell'ambiente esterno. Ci sono anche eventi evolutivi più rari e meno prevedibili con cui vengono acquisiti nuovi fattori di resistenza dai patogeni mediante

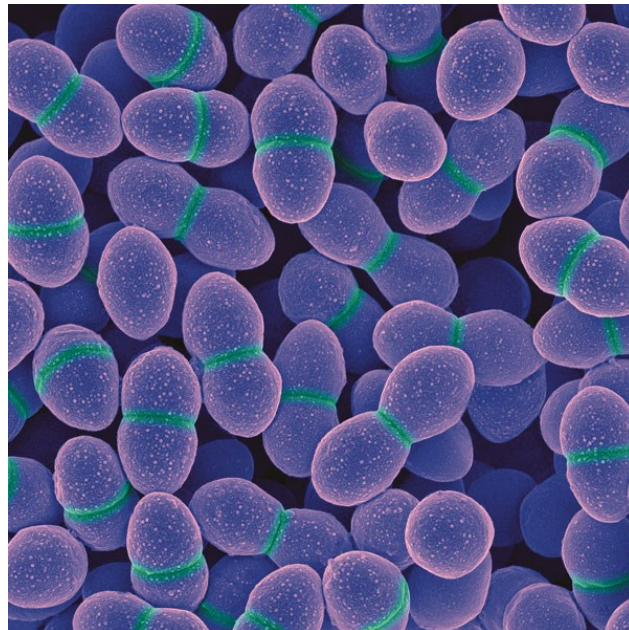


trasferimento genico orizzontale con il coinvolgimento di diverse comunità microbiche ambientali (figura 3, frecce tratteggiate). In questi casi anche singoli eventi di trasferimento possono avere conseguenze vaste e irreversibili (D. G. Joakim Larsson and Carl-Fredrik Flach, 2021).

### 1.3. Ceppi indicatori fecali

#### 1.3.1. *Enterococcus spp.*

Gli enterococchi (**Figura 4**) sono cocchi Gram-positivi comunemente residenti nel tratto intestinale dell'uomo e di molti animali. Classificati per lungo tempo, in base all'antigene di Lancefield, nel genere *Streptococcus*, tra gli streptococchi di gruppo D, vengono ora riconosciuti in un genere a sé stante, il genere *Enterococcus* (Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019).



*Figura 4; Enterococcus spp.*

Sono batteri ampiamente riconosciuti tra i principali patogeni ospedalieri. Gli enterococchi sono disposti singolarmente, a coppie o in catenelle, sono catalasi negativi, anaerobi, alotolleranti, asporigeni, con un metabolismo fermentativo di tipo lattico. La maggior parte delle specie sono immobili, e possono produrre  $\alpha$ - o  $\beta$ -emolisi in piastre di agar sangue. Inoltre, possono essere isolati da organismi invertebrati come gli insetti oltre che dai mammiferi; questo evidenzia la capacità di tali microrganismi di sopravvivere in condizioni estremamente varie. Tra queste vi sono la capacità di crescere entro ampi intervalli di temperatura (10-45°C) e pH (4.4-9.6), sopravvivere all'essiccamento e crescere in presenza di 6,5% di NaCl e 40% di sali biliari. *Enterococcus faecalis* (causa oltre l'80% delle infezioni enterococciche) ed *Enterococcus faecium* (causa circa il 10% delle infezioni enterococciche) sono le specie clinicamente più rilevanti. Tuttavia, queste proporzioni si stanno leggermente modificando, a causa del più frequente coinvolgimento di *E. faecium* nei fenomeni di antibiotico-resistenza. Si sottolinea che gli enterococchi fanno parte dei cosiddetti batteri lattici, trovano largo impiego come starter nell'industria alimentare, per la produzione di vari alimenti fermentati (formaggi, verdure fermentate, salumi) ma si isolano frequentemente anche da latte crudo, carne, pesce e frutti di mare. Gli enterococchi sono patogeni opportunisti; le infezioni, che si verificano principalmente nei pazienti ospedalizzati, includono infezioni del tratto urinario, batteriemie, infezioni intra-addominali ed endocarditi (5-20% endocarditi comunitarie). Si può affermare che sono al terzo posto come agenti patogeni nosocomiali più comuni. Nel processo patogenetico degli enterococchi, oltre ai molteplici fattori di virulenza prodotti (adesine, esotossine, enzimi idrolitici, ecc.), è implicato anche il costante aumento di ceppi resistenti agli antibiotici (BenBraïek, O., & Smaoui, S. (2019). Le

infezioni enterococciche possono avere un'origine sia esogena che endogena, nel secondo caso spesso insorgono a causa di localizzazioni improprie (ad es. a livello urinario) dei microrganismi, la cui sede fisiologica è appunto il tratto intestinale. È stato anche sostenuto, in base a studi con *E. faecalis* condotti in modelli murini, che gli enterococchi, insieme agli enterobatteri, siano capaci di traslocazione dal lume intestinale: un meccanismo che consentirebbe loro di superare la barriera intestinale, di raggiungere i linfonodi mesenterici, il fegato e la milza, e di entrare in circolo provocando batteriemie (Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Gli enterococchi hanno in genere una bassa sensibilità a molti antibiotici, oltre ad essere particolarmente capaci di sviluppare nuove resistenze. Sono intrinsecamente resistenti e tolleranti ai  $\beta$ -lattamici per la presenza di PBP (proteine leganti la penicillina) a bassa affinità. Le penicilline sono più attive nei loro confronti, mentre i carbapenemici sono meno attivi, del tutto inattive sono senza dubbio le cefalosporine. Presentano un'innata resistenza a basso livello agli aminoglicosidi a causa di un ridotto trasporto dei farmaci attraverso la membrana. Tuttavia, in combinazione con gli antibiotici attivi sulla sintesi del peptidoglicano (come penicillina e vancomicina), riescono ad entrare più facilmente nella cellula batterica, con un effetto battericida sinergico. Gli enterococchi resistenti alla vancomicina sono noti con l'acronimo VRE (vancomycin-resistant enterococci). Tale resistenza acquisita può avere caratteristiche fenotipiche e genotipiche differenti. Nel fenotipo VanA (il più importante dal punto di vista clinico), associato alla resistenza ad alto livello alla vancomicina e alla teicoplanina, la resistenza è generalmente mediata da plasmidi trasferibili che portano trasposoni correlati al prototipo Tn1546. Questo trasposone possiede un insieme di geni i quali, in presenza dell'antibiotico, inducono nella cellula batterica la produzione di un precursore del peptidoglicano modificato, in cui il dimero terminale D-alanina-

D-alanina (il normale bersaglio della vancomicina) della catena peptidica laterale è sostituito da un dimero diverso (più spesso presenta un dimero D-alanina-D-lattato), che l'antibiotico non riconosce come proprio bersaglio (Miller W. R., 2014), (Murray, B. E. (2000), (Raza T., 2018).

I ceppi VRE si sono progressivamente diffusi in ambiente nosocomiale, con caratteristiche epidemiologiche ben diverse in Europa e nel Nord America. In Europa la loro diffusione è stata limitata e più lenta, ma con ampi serbatoi a livello comunitario (animali domestici, alimenti, individui sani). Negli Stati Uniti invece, la diffusione nosocomiale è stata molto più rapida e marcata, tanto che attualmente la prevalenza di VRE può essere considerata a livelli endemici. Sempre più frequenti sono i casi di multi-resistenza (resistenza ad alto livello agli aminoglicosidi, ai beta-lattamici, ai glicopeptidi ecc.), specialmente in ceppi nosocomiali di *Enterococcus faecium* (Guzman Prieto A. M., 2016). Questo ha portato ad un aumento nell'utilizzo di antibiotici salvavita come linezolid, daptomicina e tigeciclina per il trattamento delle infezioni da VRE. Ma recentemente, si sono anche manifestate resistenze agli oxazolidinoni. Il linezolid è uno dei principali esponenti di questa classe di antibiotici, agisce sul ribosoma batterico, legandosi all'ansa centrale del dominio V nell'rRNA 23S ed inibendo così la sintesi proteica. Particolarmente preoccupante, oltre alle mutazioni spontanee del target, è la resistenza conferita dal gene *cfr*, codificante per una metilasi dell'rRNA 23S, in quanto generalmente plasmidica e trasmissibile. Addirittura, più allarmante, potrebbe essere un nuovo meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni, tipico di enterococchi sia di origine umana che animale, conferito dal gene plasmidico trasmissibile *optrA*. Questo codifica per una proteina protettiva del ribosoma, appartenente alla famiglia ABC-F. Un altro determinante di resistenza al linezolid è il gene *poxA*, che codifica per una proteina di protezione ribosomiale e causa una

ridotta sensibilità agli oxazolidinoni (Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A., 2014), (Murray, B. E., 2000), e (Sadowy E., 2018).

### 1.3.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (**Figura 5**) è il batterio più studiato appartenente al genere *Escherichia*, che prende il nome dal tedesco Theodor Escherich. Si tratta di bacilli Gram-negativi aerobi facoltativi, asporigeni, mobili o immobili, fermentanti, che appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Ewing, W. H., 1986).



*Figura 5; Escherichia coli*

Il suo habitat principale è la parte inferiore dell'apparato gastro-intestinale dell'uomo e di molti animali. Si comporta da commensale, vivendo in un'associazione reciprocamente vantaggiosa con l'ospite, ma può anche essere patogeno opportunisto, soprattutto in ambito nosocomiale, causando infezioni delle vie respiratorie, dell'apparato urogenitale, peritoniti, osteomieliti, artriti, sepsi, meningiti. La specie *E. coli* può essere distinta, dal

punto di vista sierologico, in molteplici sierotipi in base agli antigeni somatici O, agli antigeni capsulari K ed agli antigeni flagellari H. Per ciascun ceppo isolato può essere stabilita una specifica formula antigenica. La patogenicità di *E. coli* deriva da numerosi fattori di virulenza, quali: adesine, endotossine ed esotossine, siderofori, sistemi di secrezione ecc.

Esistono diversi ceppi patogeni di *E. coli*, tra cui ceppi enteropatogeni e i ceppi patogeni Extraintestinali (ExPEC). I primi comprendono gli Enterotossigenici (ETEC), Enteroinvasivi (EIEC), Enteropatogeni (EPEC), Enteroemorragici (EHEC), Enteroaggreganti (EAEC) e i Diffusamente aderenti (DAEC). I ceppi ExPEC sono di particolare importanza in quanto responsabili infezioni nosocomiali e comunitarie: gli Uropatogeni (UPEC) che causano l'80% delle infezioni urinarie nell'uomo e i ceppi della Meningite Neonatale (NMEC) che sono una delle principali cause di meningite batterica neonatale nei paesi sviluppati (Gomes T., 2016), (Kenny B., 1997), (Masulli N., 2013) e (Gomes T., 2016).

Per quanto riguarda i meccanismi di resistenza agli antibiotici, *E. coli* è intrinsecamente resistente alla penicillina G, il primo  $\beta$ -lattamico introdotto nella pratica clinica. La resistenza ad ampio spettro ai  $\beta$ -lattamici è dovuta principalmente alla produzione di  $\beta$ -lattamasi. Queste rappresentano un'ampia categoria di enzimi, codificati spesso da plasmidi, che bloccano l'attività di tali antibiotici idrolizzando l'anello  $\beta$ -lattamico. Ad oggi, questi enzimi si trovano principalmente negli isolati nosocomiali di *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli* (Ramirez MS and ME Tolmasky, 2010).

## **1.4. Trasferimento genico orizzontale (HGT)**

Negli ultimi anni l'antibiotico resistenza sta diventando una vera e propria emergenza sanitaria poiché gli antibiotici in uso perdono progressivamente efficacia contro un numero crescente di batteri patogeni. Il trasferimento genico orizzontale (HGT) contribuisce in modo significativo alla rapida diffusione delle resistenze. Tuttavia, le dinamiche di trasmissione dei geni che conferiscono resistenza agli antibiotici sono poco conosciute. Meccanismi multipli di HGT rappresentano nei procarioti un'alternativa fondamentale alla normale eredità genetica verticale. La coniugazione mediata da plasmidi, la trasduzione mediata da batteriofagi, e la trasformazione naturale consentono scambi di materiale genetico tra ceppi diversi e a volte anche tra specie batteriche diverse. Lo sviluppo della resistenza agli antibiotici si ritiene che sia stato guidato dalla crescente pressione selettiva esercitata dagli antibiotici utilizzati in numerose applicazioni, non solo terapeutiche. Il trasferimento genico orizzontale (HGT) aggiunge una dimensione importante alle malattie infettive, in quanto geni di resistenza agli antibiotici (ARG) possono essere trasferiti anche a patogeni non correlati tra loro (Nicole A. Lermينياux and Andrew D.S. Cameron, 2019). I batteri resistenti agli antibiotici, in particolare quelli multi-resistenti, sono un problema sanitario con gravità crescente in tutto il mondo. Ad oggi è abbastanza chiaro che sia i batteri Gram-negativi, che quelli Gram-positivi sono in grado di vincere la sfida evolutiva della lotta ai farmaci antibatterici, acquisendo determinanti di resistenza preesistenti da un pool genico batterico. Questo è possibile grazie ad attività peculiari di elementi genetici mobili in grado di muoversi all'interno o tra le molecole di DNA, che includono sequenze di inserzione, trasposoni, integroni, e tratti di DNA che sono in grado di trasferirsi tra cellule batteriche,

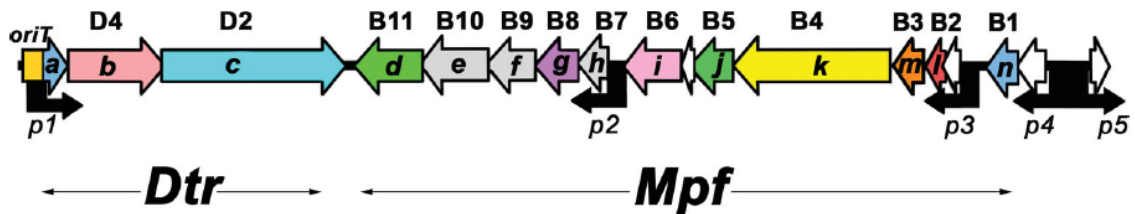
come plasmidi ed elementi coniugativi integrativi. Insieme, questi elementi giocano un ruolo centrale nel facilitare lo scambio genetico orizzontale, promuovendo l'acquisizione e la diffusione dei geni di resistenza. Questi curiosi fenomeni si concentrano in particolar modo nel cosiddetto gruppo di organismi ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. ed *Escherichia coli*), che sono diventati i patogeni ospedalieri più problematici (Sally R. Partridge, Stephen M. Kwong, Neville Firth, Slade O. Jensen, 2018).

#### **1.4.1. Coniugazione batterica**

La coniugazione batterica è un processo mediante il quale viene trasferito materiale genetico da una cellula donatrice ad una cellula ricevente. Il trasferimento dei geni coniugativi richiede un macchinario sofisticato che assicura la mobilizzazione del DNA. Può essere definita come uno dei principali meccanismi per il trasferimento genico orizzontale, costituendo un elemento chiave nella diffusione di geni di resistenza agli antibiotici e di virulenza ai batteri patogeni umani. Nei batteri Gram-negativi, il trasferimento del DNA è mediato, più in dettaglio, da una struttura macromolecolare coinvolta nel trasporto del substrato e nella biogenesi del pilo, associato alla membrana, chiamato sistema di secrezione di tipo IV (T4SS). I T4SS coniugativi sono essenziali per la formazione di coppie di coniugazione (mating pair formation, MPF) e, quindi, i geni che codificano per le proteine T4SS sono chiamati geni MPF. I plasmidi coniugativi che codificano il proprio set di geni MPF sono autotrasmissibili. Altri plasmidi invece, mancano del proprio set di geni MPF e dipendono dal T4SS di un altro plasmide coniugativo per la loro



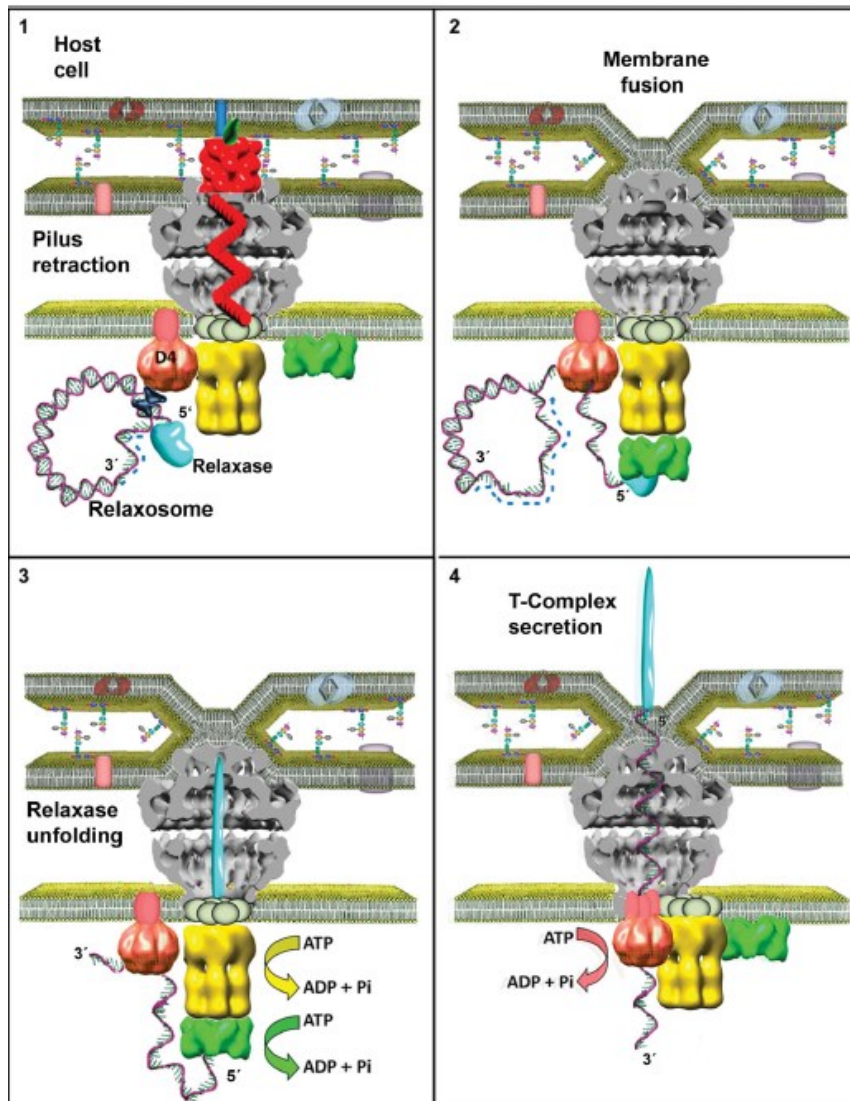
mobilizzazione. I geni che codificano per queste proteine sono organizzati in operoni e sono sotto il controllo di diversi promotori, con una netta distinzione tra quelli che sono coinvolti nell'accoppiamento (Mpf) e quelli che invece si occupano del trasferimento del DNA (dna transfer protein, Dtr) (**Figura 6**).



**Figura 6;** struttura genetica delle regioni Mpf e Dtr del plasmide coniugativo R388. I geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione delle coppie di coniugazione (Mpf) sono organizzati in operoni che sono separati da quelli coinvolti nel trasferimento del DNA (Dtr). I geni Mpf codificano per proteine che si assemblano nel sistema di secrezione di tipo IV, mentre i geni Dtr codificano per proteine che si legano all'origine della regione di trasferimento, *oriT* (nel DNA), formando il relaxosoma. Questa organizzazione genica modulare è condivisa dalla maggior parte dei sistemi coniugativi, mostrando un alto grado di conservazione.

Nell'architettura T4SS, che è ben conservata nella maggior parte dei sistemi coniugativi, si possono distinguere quattro domini proteici: il pilus, il complesso del canale centrale, la piattaforma della membrana interna e l'enzima ATPasi esamerica alla base del canale, che fornisce l'energia per la biogenesi del pilus e per il trasporto del substrato.

Come è mostrato nella **Figura 7**, il contatto delle cellule donatrici con quelle riceventi, mediato dal pilus, potrebbe essere innescato da specifici fattori. A seguito del contatto cellulare, la retrazione del pilo extracellulare facilita l'interazione tra le membrane delle cellule donatrici e riceventi, determinando un processo di fusione delle stesse.

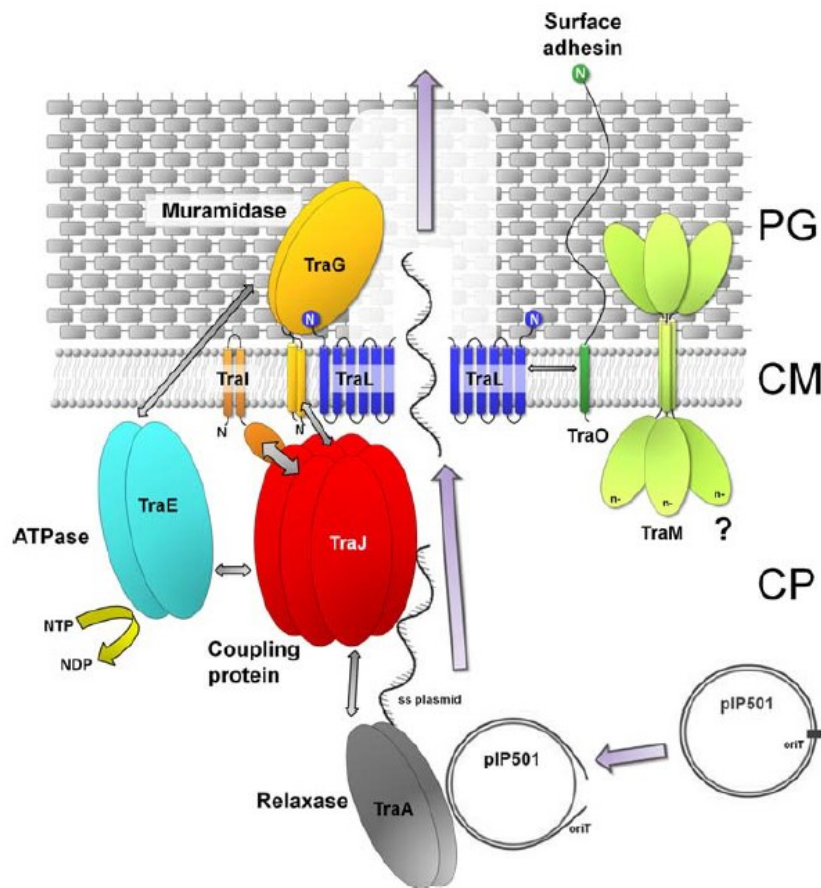


*Figura 7; sistema di secrezione di tipo IV (T4SS)*

Contemporaneamente, o prima di questa specifica fase, la proteina di accoppiamento guida il relaxosoma verso il canale di secrezione e il substrato nucleoproteico viene trasferito. Si assiste quindi alla traslocazione del DNA dal donatore al ricevente in una direzione 5-3 (E. Cabezòn, 2015). Dunque, i passaggi principali della coniugazione possono essere distinti in: riconoscimento (proteine Mpf), segnalazione e accoppiamento (VirD4), trasferimento del DNA (proteine Dtr). Sono molteplici i geni coinvolti nel

processo; i geni di trasferimento (Tra) coinvolti nel contatto tra le cellule e nel trasporto di DNA dal donatore al ricevente tramite un poro specializzato; altri garantiscono la sopravvivenza del DNA nell'ambiente dell'ospite. Nei batteri Gram-negativi si utilizza quasi esclusivamente il sistema T4SS. I T4SS dei batteri Gram-positivi (G<sup>+</sup>) mostrano notevoli somiglianze con quelli dei Gram-negativi (G<sup>-</sup>); tuttavia, l'effettivo processo di traslocazione del DNA sembra differire considerevolmente tra i due. Ciò potrebbe dipendere dalla differente struttura dell'involucro cellulare: la membrana citoplasmatica seguita da uno spesso multistrato di peptidoglicano (PG) nei batteri Gram-positivi, rispetto a due membrane con uno spazio periplasmatico e un sottile strato di PG tra le due membrane nei batteri Gram-negativi. La grande maggioranza di batteri Gram-positivi sembra scambiarsi DNA a singolo filamento attraverso un sistema T4SS, che sembra essere organizzato in modo più semplice rispetto a quello dei Gram-negativi. I batteri Gram-positivi, come *Streptomyces*, utilizzano invece un meccanismo completamente diverso che ricorda i macchinari coinvolti nella divisione cellulare batterica o nella formazione di spore. Inoltre, una volta che una cellula di *Streptomyces* ha acquisito un plasmide, lo può facilmente trasferire a cellule adiacenti, attraverso un processo chiamato diffusione. Nella **Figura 8**, ad esempio, è possibile osservare il trasferimento di pIP501, un plasmide modello Gram-positivo ad ampio spettro, utilizzato in modo intensivo per studiare la replicazione e il trasferimento coniugativo. Il sistema T4SS per il trasferimento del plasmide pIP501 comprende due componenti principali del canale: la proteina TraM, che agisce come un omologo di VirB8, e la proteina TraL. L'organizzazione del complesso T4SS è stata suggerita dalle sue somiglianze di struttura con le proteine VirB8 dei Gram-negativi. Nel modello T4SS dei Gram-positivi (Chatti M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. 2013), l'omologo di VirB6 (TraM) fa parte del

complesso citoplasmatico translocone/ATPasi. La proteina TraL ha interazioni con la proteina citoplasmatica TraN e con la presunta adesina superficiale TraO. Poiché le proteine VirB6 sono altamente conservate tra G- e G+, si ipotizza che i T4SS svolgano un ruolo molto importante nell'impalcatura del canale di secrezione di membrana, come suggerito per i sistemi di trasferimento dei Gram-negativi (N. Goessweiner-Mohr, K. Arends, W. Keller and E. Grohmann, 2014).



**Figura 8;** modello del pathway di trasferimento di pIP501. Innanzitutto, oriTpIP501 è vincolato dal rilassamento di TraA. Dopo essere stato intaccato, il plasmide a singolo filamento viene reclutato nel presunto canale di trasferimento tramite l'accoppiamento di due proteine TraJ. L'ombreggiatura ridotta di PG simboleggia l'apertura locale mediata da TraG. La localizzazione e l'orientamento delle proteine T4SS si basa su previsioni in silico e studi di localizzazione. Lo spessore delle frecce segna la forza delle interazioni rilevate.

Negli enterococchi, e in particolare nella specie *E. faecalis*, è stato poi descritto il trasferimento coniugativo di plasmidi di risposta ai feromoni in cui il contatto tra le cellule del donatore e del ricevente è mediato da piccoli peptidi, i cosiddetti feromoni sessuali, che sono prodotti da potenziali ceppi riceventi. La cellula donatore che possiede il plasmide di risposta corrispondente a quei determinati feromoni produrrà dei recettori specifici e la cosiddetta sostanza di aggregazione superficiale (codificati dal plasmide) che consentirà il contatto tra i due partner. Per l'appunto, pAD1 e pCF10 sono plasmidi sensibili ai feromoni sessuali presente in molti ceppi di *E. faecalis* (Dunny GM. 2007). Studi genetici e fisiologici sul trasferimento di questi plasmidi hanno portato al rilevamento di *E. faecalis*, che trasferisce in modo efficiente il plasmide pCF10, attraverso un sistema T4SS. Il plasmide di resistenza alla tetraciclina pCF10 (67,6 kb), che è stato trovato solo negli enterococchi, codifica per funzioni di risposta ai feromoni (N. Goessweiner-Mohr, K. Arends, W. Keller and E. Grohmann 2014). In generale, nei sistemi di trasferimento del DNA, molte questioni essenziali restano irrisolte, come il meccanismo con cui il complesso nucleoproteico entra nella cellula ricevente, superando la barriera della membrana, o il meccanismo mediante il quale si impedisce l'ingresso di un secondo plasmide identico nella cellula (Garcillan-Barcia e de la Cruz, 2008). Si sa poco sugli specifici recettori nella cellula ricevente che consentono l'attacco del pilus. Nonostante alcune questioni irrisolte, è ormai chiaro che il trasferimento genico orizzontale è stata una delle principali forze evolutive che ha costantemente rimodellato i genomi batterici nel corso dell'evoluzione (E. Cabezòn, 2015).

## 1.5. I mitili

I mitili (*Mytilus spp.*) sono organismi invertebrati, appartenenti al phylum dei molluschi e alla classe dei bivalvi. Sono molto comuni nei mari temperati di tutto il mondo, e in particolare nel Mediterraneo, le specie *M. galloprovincialis* e *M. edulis* sono le più note perché ampiamente utilizzate sia come alimento (frutto di mare) sia come indicatori di inquinamento antropogenico delle acque costiere (Goldberg, 1975, 1980; Farrington et al., 2016) per la loro attività di filtratori (**Figura 9**). Si tratta di organismi sessili, in grado di colonizzare una varietà di substrati in acque marine poco profonde, da dove possono essere facilmente raccolti. Possono crescere anche adesi a scogliere artificiali, alle banchine dei porti, a corde galleggianti, frammenti di polistirolo, legname, boe in materiale plastico e in metallo, ecc. Poiché sono creature resistenti e facili da mantenere in coltura sono particolarmente adatti per studi ecotossicologici e analisi *in situ*.



*Figura 9; Mytilus edulis*

I mitili hanno una notevolissima capacità di adattamento e possono tollerare elevate variazioni delle condizioni fisiche e chimiche dell'acqua. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che possono mantenere pressoché inalterato il loro metabolismo, anche se posti repentinamente in ambienti a differenti range di temperatura. Tuttavia, i mitili, se posti in acque a temperature medio-alte, per esempio a 20°C, sono in grado di filtrare quasi 5 litri di acqua ogni ora, mentre a 15 °C la quantità filtrata scende a 1.5 litri per ogni ora, il che incide notevolmente sulla loro velocità di crescita. Le cozze, filtrando grandi volumi d'acqua attraverso le loro branchie lamellari, si nutrono principalmente di microalghe planctoniche, ma quando necessario possono anche sfruttare altre fonti di cibo presenti in acqua come i batteri (Jacobs et al., 2015) e persino mangimi per pesci d'acquacoltura (Redmond et al., 2010) (Famme et al., 1986). In condizioni di eccedenza alimentare, la cozza continua a filtrare l'acqua di mare alla massima velocità, ma elimina il cibo in eccesso sotto forma di particelle di pseudofeci, che consistono in una miscela di muco e particelle alimentari non digerite. La produzione di pseudofeci è ecologicamente importante per molte altre specie, ma a volte può portare allo sviluppo di condizioni di sedimento anossico soprattutto negli impianti di maricoltura. I molluschi bivalvi, grazie alla loro attività di filtrazione hanno la capacità di concentrare nei loro tessuti anche microrganismi potenzialmente patogeni, biotossine o sostanze chimiche inquinanti presenti nell'acqua circostante, contribuendo al trasferimento di agenti patogeni e sostanze dannose lungo la catena trofica marina, oltre a costituire un rischio per la salute umana quando vengono consumati crudi o poco cotti (Wang e Fisher, 1999; Haukas et al., 2010; Farrell e Nelson, 2013; Larsen et al., 2016). Le normative europee (UE) richiedono di valutare la loro sicurezza attraverso il monitoraggio della qualità microbiologica dei molluschi e delle aree di raccolta, utilizzando il conteggio

di *E. coli* come indicatore di inquinamento fecale. Il periodico monitoraggio microbiologico delle acque costiere e delle aree di raccolta dei molluschi fornisce una valutazione del rischio di contaminazione da agenti patogeni batterici e virali e consente l'assegnazione delle aree di raccolta a classi diverse (A, B o C) (CE, 2004). I molluschi bivalvi provenienti da aree di classe A soddisfano gli standard sanitari (*E. coli*  $\leq 230$  MPN/100 g) e possono essere subito consumati, mentre quelli raccolti da aree di classe B (*E. coli*  $\leq 4,6 \times 10^3$  MPN/100 g nel 90% dei campioni e non superiore a  $4,6 \times 10^4$  MPN/100 g nel restante 10% dei campioni) e classe C (*E. coli*  $\leq 4.6 \times 10^4$  MPN/100 g) richiedono un trattamento post-raccolta per ridurre la contaminazione microbiologica prima della commercializzazione (CE, 2004, a; CE, 2005; CE, 2008) (C. Vignaroli et al., 2016).



## 2. SCOPO DEL LAVORO

In un preoccupante scenario, in cui un utilizzo spropositato ed a volte errato dei farmaci antibatterici ha contribuito allo sviluppo di antibiotico-resistenze e alla loro diffusione nell'ambiente, compreso quello marino, abbiamo ritenuto interessante approfondire se ambienti costieri fortemente influenzati da attività antropiche, possano rappresentare non solo riserve di batteri antibiotico-resistenti potenzialmente patogeni per l'uomo, ma anche facilitare la diffusione di geni di resistenza. In particolare, abbiamo voluto verificare se organismi filtratori marini come i molluschi bivalvi possano rappresentare in natura, un habitat favorevole agli scambi genetici tra batteri.

A tale scopo in questo lavoro di tesi: i) sono stati caratterizzati alcuni ceppi di *Enterococcus spp.*, isolati da sedimento marino, particolarmente interessanti da un punto di vista delle antibiotico-resistenze; ii) è stata valutata la sopravvivenza in acqua di mare artificiale di alcuni ceppi di *Enterococcus spp.* e la diversa capacità di bioaccumulo da parte di molluschi bivalvi in differenti condizioni di temperatura; iii) è stata valutata la possibilità che i mitili possano essere un serbatoio ambientale di batteri antibiotico-resistenti e un ambiente favorevole allo scambio di geni di antibiotico-resistenza, allestendo degli "acquari" per la stabulazione dei molluschi in cui sono stati eseguiti degli esperimenti di coniugazione batterica *in vivo*.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. Ceppi batterici utilizzati

I ceppi utilizzati in questo studio sono stati ottenuti da una campagna di campionamento in mare effettuata nei periodi di giugno/luglio 2019 e giugno/luglio 2020 in 10 siti antistanti la costa nei pressi di Ancona. In particolare, i campionamenti sono stati effettuati all'interno del porto, alla foce del fiume Esino, nell'area antistante l'ospedale regionale delle Marche (Torrette), alla foce del fiume Musone e alla foce del fiume Potenza. Per ogni sito, sono stati prelevati campioni di sedimento, acqua e zooplancton.

Altri ceppi utilizzati per il lavoro di tesi sono ceppi di riferimento o ceppi precedentemente isolati, appartenenti alla collezione del laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche. Questi comprendono: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* 64/3, *E. faecalis* JH2-2, *E. coli* 1816 e *E. coli* ISZ220.

In particolare, in questo studio, sono stati caratterizzati alcuni ceppi del genere *Enterococcus* interessanti per quanto riguarda il loro profilo di antibiotico-resistenza. Nella **Tabella 1** è indicata la nomenclatura alfanumerica di riferimento, mentre nella **Tabella 2** sottostante sono riportati tutti gli isolati ottenuti con le loro caratteristiche di resistenza e in evidenza gli enterococchi che sono stati selezionati per questo specifico lavoro di tesi.

**Tabella 1;** nomenclatura alfanumerica basata sul sito di campionamento, matrice di provenienza, specie/genere, antibiotico a cui sono resistenti e numero progressivo di isolamento

Sito di campionamento	Matrice di provenienza	Specie/genere	Antibiotico	N°
(Ancona) A: potenza sud B: potenza fronte C: potenza nord E: musone H: porto 1 J: esino nord K: esino fronte L: esino sud M: torrette largo N: torrette fronte O: torrette sud	S: sedimento H: acqua Z: zooplancton	C: <i>E. coli</i> E: Enterococco V: <i>Vibrio</i>	( <i>E. coli</i> ) C: colistina F: cefotaxime E: ertapenem S: fosfomicina  (Enterococchi) F: florfenicolo V: vancomicina D: daptomicina A: ampicillina G: gentamicina  ( <i>Vibrio</i> ) A: ampicillina C: cloramfenicolo S: streptomina G: gentamicina T: tetraciclina P: ciprofloxacina	numero progressivo di isolamento
(Genova) P: sito 1 Q: sito 2 R: sito 3				

**Tabella 2 ;** valori di MIC dei ceppi di *Enterococcus spp.* testati sui vari antibiotici. S =sensibile, R = resistente. GEN = gentamicina, AMP = ampicillina, DAPTO = daptomicina, VANCO = vancomicina, FFC = florfenicolo. \* profilo di resistenza MDR.

CEPPO	MIC (µg/ml)				
	GEN	AMP	DAPTO	VANCO	FFC
HSEG1	> 1024 R	S	S	S	S
HSEG2	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
HSEG3	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
HSEG4	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
HSEG6	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
JSEG1	> 1024 R	S	S	S	S
JSEG2	> 1024 R	S	S	S	S
JSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
JSEG8	> 1024 R	S	S	S	S
<b>KSEGI*</b>	<b>&gt; 1024 R</b>	<b>&gt; 32 R</b>	<b>S</b>	<b>&gt; 128 R</b>	<b>S</b>

KSEG2*	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KSEG3*	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KSEG6	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
KSEG7*	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
LSEG1	> 1024 R	S	S	S	S
LSEG2	> 1024 R	S	S	S	S
LSEG3	> 1024 R	S	S	S	S
LSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
LSEG6	> 1024 R	S	S	S	S
NSEG1	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
NSEG3	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
NSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
NSEG5	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
OSEG4	> 1024 R	32 R	S	S	S
OSEG5	> 1024 R	> 32 R	S	S	S
OSEG6	> 1024 R	16 R	S	S	S
HSEA1	S	32 R	S	S	S
HSEA2	S	16 R	S	S	S
HSEA3	S	> 32 R	S	S	S
HSEA4	S	32 R	S	S	S
HSEA5	S	> 32 R	S	S	S
HSEA6	S	32 R	S	S	S
HSEA7	S	32 R	S	S	S
JSEA1	S	32 R	S	S	S
JSEA2	S	32 R	S	S	S
JSEA4	S	32 R	S	S	S
KSEA1	S	32 R	S	S	S
LSEA1	S	32 R	S	S	S
LSEA2	S	> 32 R	S	S	S
LSEA3	S	> 32 R	S	S	S
LSEA4	S	32 R	S	S	S
LSEA5	S	32 R	S	S	S
LSEA6	S	32 R	S	S	S
LSEA7	S	32 R	S	S	S
LSEA8	S	32 R	S	S	S

NSEA1	S	16 R	S	S	S
NSEA2	S	16 R	S	S	S
NSEA3	S	16 R	S	S	S
NSEA4	S	16 R	S	S	S
NSEA6	S	32 R	S	S	S
OSEA2	S	16 R	S	S	S
OSEA5	S	16 R	S	S	S
JSEF2	> 1024 R	S	S	S	128 R
JSEF3	> 1024 R	S	S	S	128 R
JSEF4	> 1024 R	S	S	S	128 R
JSEF5	> 1024 R	S	S	S	128 R
PSEG2	> 1024 R	S	S	S	S
PSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
PSEG6	> 1024 R	S	S	S	S
PSEG8	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG1	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG2	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG3	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG5	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG6	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG7	> 1024 R	S	S	S	S
QSEG8	> 1024 R	S	S	S	S
QZEG1	> 1024 R	S	S	S	S
QZEG2	> 1024 R	S	S	S	S
QZEG3	> 1024 R	S	S	S	S
QZEG4	> 1024 R	S	S	S	S
QZEG5	> 1024 R	S	S	S	S
RSEG1	> 1024 R	S	S	S	S
RESG3	> 1024 R	S	S	S	S
RSEG4	> 1024 R	S	S	S	S
RSEG5	> 1024 R	S	S	S	S
RSEG6*	> 1024 R	16 R	S	S	16 R
RSEG7	> 1024 R	S	S	S	S
RSEG8	> 1024 R	S	S	S	S

PSEF5	S	S	S	S	64 R
QZEF1	S	S	S	S	64 R
QZEF2	S	S	S	S	64 R
QZEF3	S	S	S	S	128 R
QZEF4	S	S	S	S	64 R
QZEF5	S	S	S	S	128 R
QZEF6	S	S	S	S	64 R
QZEF7	S	S	S	S	64 R
QZEF8	S	S	S	S	64 R
RSEF2	> 1024 R	S	S	S	64 R
JSEG9	512 R	S	S	S	S
JSEG10	512 R	S	S	S	S
JSEG11	512 R	S	S	S	S
JSEG12	512 R	S	S	S	S
JSEG13	512 R	S	S	S	S
JSEG14	512 R	S	S	S	S
NSEG12	512 R	S	S	S	S
OSEG9	512 R	> 32 R	S	S	S
OSEG15	512 R	S	S	S	S
HSEA8	S	32 R	S	S	S
JSEA8	S	32 R	S	S	S
KSEF1	S	S	S	S	64 R
KSEF2	S	S	S	S	64 R
KSEF3	S	S	S	S	64 R
KSEF4	S	S	S	S	64 R
KSEF5	S	S	S	S	64 R
KSEF6	S	S	S	S	64 R
KSEF7	S	S	S	S	64 R
KSEF8	S	S	S	S	64 R
LSEF1	S	S	S	S	64 R
LSEF2	S	S	S	S	64 R
LSEF3	S	S	S	S	64 R
LSEF4	S	S	S	S	64 R
LSEF5	S	S	S	S	64 R
LSEF6	S	S	S	S	64 R

LSEF7	S	S	S	S	64 R
LSEF8	S	S	S	S	64 R
KSEF9	S	S	S	S	64 R
KSEF10	S	S	S	S	64 R
LSEF14	S	S	S	S	64 R
LSEF16	S	S	S	S	64 R
KHED1	S	S	32 R	S	S
KHED2	S	S	S	S	S
KHED3	S	S	16 R	S	S
KHED4	S	S	8 R	S	S
MSED1	S	S	S	S	S
LSEG7	512 R	S	8 R	S	S
LSEG8	1024 R	S	S	S	S
KHEG2*	>1024 R	>32 R	S	128 R	S
JSEG15	>1024 R	>32 R	S	S	S
JSEG16	S	32 R	S	S	S
OSEG16	>1024 R	S	S	S	S
OSEG17	>1024 R	S	S	S	S
OSEG18	>1024 R	S	S	S	S
OSEG19	>1024 R	S	S	S	S
KSEG8	S	S	S	S	S
ASEA1	S	>32 R	S	S	S
ASEA2	S	>32 R	S	S	S
ASEA3	S	>32 R	S	S	S
ASEA4	S	S	S	S	S
ASEA5	S	>32 R	S	S	S
ASEA6	S	>32 R	S	S	S
ASEA7	S	>32 R	S	S	S
AZEA1	S	S	S	S	S
AZEA4	S	S	S	S	S
BSEA1	S	>32 R	S	S	S
BSEA2	S	S	S	S	S
BZEA1	S	S	S	S	S
CSEA1	S	S	S	S	S
BZED1	S	S	S	S	S

BZED2	S	S	S	S	S
CHED1	S	S	S	S	S
CHED2	S	S	64 R	S	S
BSEG1	>1024 R	S	S	S	S
BSEG2	>1024 R	S	S	S	S
BSEG3	>1024 R	S	S	S	S
BSEG4	>1024 R	S	S	S	S
BSEG5	>1024 R	S	S	S	S
BSEG6	>1024 R	S	S	S	S
<b>BSEG7</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>64 R</b>	<b>S</b>
<b>ASEF1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>ASEF2</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>ASEF3</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>ASEF4</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>BSEF2</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>
<b>BSEF3</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>
<b>BSEF4</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>
<b>BSEF5</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>
<b>ESEF1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>ESEF2</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>64 R</b>
<b>ESEF3</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>
<b>ESEF4</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>16 R</b>
<b>ESEF5</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>32 R</b>
<b>ESEF6</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>128 R</b>

### 3.2. Terreni di coltura e antibiotici

I terreni di coltura scelti per la crescita dei ceppi batterici sono i seguenti:

- **Plate Count Agar (PCA)**; è un terreno solido non selettivo utilizzato in microbiologia, solitamente per il conteggio della flora aerobica totale in campioni di acqua e di alimenti secondo gli standard ISO4833 e ISO7698. Le sostanze nutritive fornite dal peptone, i fattori di crescita



contenuti nell'estratto di lievito e il glucosio fonte di energia favoriscono la crescita della maggior parte dei batteri aerobi.

- **Slanetz Bartley (SB)**; è un terreno selettivo e differenziale utilizzato solitamente per l'isolamento ed il conteggio degli Enterococchi in campioni di origine clinica e non. La presenza di sodio azide inibisce lo sviluppo dei germi contaminanti eventualmente associati al campione, mentre il cloruro di trifeniltetrazolio funge da indicatore; i microrganismi che lo riducono, come i ceppi appartenenti alla specie *Enterococcus faecium*, formano colonie rosse.
- **Brain Heart Infusion (BHIA) agar e Brain Heart Infusion Broth (BHIB)**; sono terreni generici contenenti un infuso di cuore e cervello di origine animale. Si è dimostrato efficace per la coltura di un'ampia varietà di microrganismi, inclusi diversi tipi di patogeni, funghi e lieviti. Oltre all'infuso di cuore e di cervello, contiene solitamente, cloruro di sodio, glucosio e sodio fosfato bibasico. I peptoni contenuti nell'infuso sono fonte di azoto, carbonio, zolfo, vitamine e micronutrienti; mentre il glucosio, è lo zucchero che molti microrganismi utilizzano come fonte di energia nella fermentazione.
- **MacConkey (MC)**; è un terreno di coltura solido selettivo e differenziale per i batteri Gram negativi. Il cristalvioletto e i sali biliari sono gli agenti selettivi che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi. L'agar MacConkey è, inoltre, differenziale, infatti, contiene il lattosio come unica fonte di carboidrati ed il rosso neutro (un indicatore di pH che vira al rosso quando il pH del mezzo scende al di sotto di 6,8). I batteri che fermentano il lattosio si presentano sotto forma di colonie con sfumature di rosso, poiché producono acidi misti che diminuiscono

il pH. Quelli che non lo fermentano invece, formano colonie incolori. A seconda dell'intensità della fermentazione si possono distinguere vari gruppi di batteri, tra cui il genere *Escherichia*, che comprende batteri fortemente fermentanti il lattosio produttori di colonie rosse con un'area

- **Mueller Hinton II (MHII)**; è il terreno abitualmente utilizzato per i test di sensibilità agli agenti antimicrobici di aerobi a crescita rapida o anaerobi facoltativi, come stafilococchi, enterococchi, famiglia *Enterobacteriaceae* e aerobi Gram-negativi (*Pseudomonas spp.*). Mueller Hinton II Agar, oltre all'estratto di carne, amido e caseina, contiene, in particolare, una bassa concentrazione di timina e timidina e un livello controllato di calcio e magnesio.

I seguenti antibiotici sono stati utilizzati per *Enterococcus spp.* negli esperimenti di coniugazione o nei saggi di determinazione della MIC:

- **La rifampicina**; un polichetone appartenente alla classe chimica delle ansamicine. Il cromoforo naftochinonico è ciò che conferisce al farmaco il suo caratteristico colore cristallino rosso-arancio. La rifampicina agisce direttamente sulla sintesi di RNA messaggero, andando ad inibire la RNA Polimerasi delle cellule batteriche, legandosi alla subunità  $\beta$  e bloccando così la trascrizione dell'RNA e la conseguente traduzione in proteine.
- **L'acido fusidico**; un farmaco attivo specialmente sui cocci Gram-positivi, stafilococchi, pneumococchi e streptococchi. In vitro e più raramente in vivo, può emergere resistenza. Il farmaco espleta la sua attività batteriostatica inibendo l'enzima translocasi dei batteri.
- **Gli amfenicoli** (tra cui il **florfenicolo**) sono antibiotici a largo spettro,

essendo efficaci su un gran numero di patogeni Gram-positivi, Gram negativi, e anche su patogeni intracellulari. L'attività di inibizione della sintesi proteica è data dalla formazione di un legame irreversibile con la subunità ribosomiale 50S, il quale comporta l'inibizione dell'attività transpeptidasica, con impossibilità di trasferire il legame peptidico dal t-RNA al peptide in formazione.

- **La vancomicina;** un farmaco antibiotico, che fa parte, insieme con la teicoplanina, della classe dei glicopeptidi. Esercita la sua azione antibiotica inibendo la sintesi della parete cellulare batterica, cioè inibisce la sintesi del peptidoglicano nei batteri Gram-positivi.

I seguenti antibiotici sono stati utilizzati per *Escherichia coli* negli esperimenti di coniugazione o nei saggi di determinazione della MIC:

- **Le tetracicline;** un gruppo di antibiotici ad ampio spettro che mostrano attività batteriostatica contro un'ampia gamma di microrganismi, inclusi batteri Gram-positivi e Gram-negativi, Clamidio, Micoplasmi, Rickettsie e Protozoi. Inibiscono la sintesi proteica legandosi in modo reversibile alla subunità ribosomiale 30S e impedendo all'aminoacil tRNA di legarsi al sito A del ribosoma. Inoltre, possono legare la subunità ribosomiale batterica 50S e possono alterare la membrana citoplasmatica, causando la fuoriuscita di componenti intracellulari dalle cellule batteriche.
- **L'acido nalidixico** (o anche **acido nalidissico**); un acido carbossilico, capostipite della classe dei chinoloni, che funge da agente antibatterico. Il composto esercita un'attività di tipo battericida grazie all'inibizione della replicazione del DNA batterico. Lo spettro dell'antibiotico comprende in particolare i germi Gram negativi.

- **La rifampicina;** descritta precedentemente.

Per ciascun farmaco antibatterico sono state preparate delle soluzioni stock iniziali a concentrazione nota nell'opportuno diluente. Le soluzioni di florfenicolo, rifampicina, acido fusidico e acido nalidixico sono state preparate a concentrazioni di 10 mg/ml in etanolo, mentre lo stock di tetraciclina è stato preparato a 100mg/ml in acqua sterile.

### **3.3. Saggi di Coniugazione *in vitro***

È stata utilizzata la tecnica di coniugazione *in vitro* su filtro (Vignaroli C, G Zandri, L Aquilanti, S Pasquaroli, Francesca Biavasco, 2011), valutando il trasferimento della resistenza al florfenicolo e alla tetraciclina. La tecnica utilizzata si compone delle seguenti fasi:

- Allestimento brodocolture overnight dei ceppi donatori e riceventi in 5 ml di BH brodo
- Sub-inoculo dei ceppi in 10 ml di BH brodo e crescita in bagno agitato a 37°C per 4 ore per ottenere i ceppi in fase di crescita logaritmica
- La brodocoltura del ceppo donatore e quella del ceppo ricevente viene mescolata in rapporto 1:10
- Montaggio dell'apparato di filtrazione, precedentemente sterilizzato (filtri di diametro 4,7 mm, con pori di 0,22µm)
- Filtrazione della brodocoltura contenente il mix donatore/ricevente
- Prelievo, con pinze sterili, del filtro e posizionamento al centro di una piastra di BH agar

- Incubazione della piastra overnight in termostato a 37 °C
- Prelievo del filtro e immersione in una falcon contenente 10 ml di soluzione fisiologica sterile
- Risospensione (vortex) della patina microbica presente sul filtro
- Eliminazione del filtro e trasferimento della sospensione in una provetta da 15 ml
- Centrifugazione per 10 minuti a 10000g
- Eliminazione del sovrantante e risospensione del pellet (costituito dalle cellule batteriche) in 1 ml di soluzione fisiologica sterile
- Allestimento di diluizione seriali (1:10) in soluzione fisiologica sterile
- Semina per spatolamento delle opportune diluizioni su terreni contenenti gli antibiotici per la selezione del donatore, del ricevente e degli eventuali transconiuganti.

In particolare, per ciascun esperimento di coniugazione sono stati preparati terreni di coltura selettivi (MC o SB), contenenti gli antibiotici specifici a seconda delle resistenze dei ceppi batterici in esame. Nelle coniugazioni in cui sono stati utilizzati gli enterococchi, sono state preparate piastre contenenti 10µg/ml di florfenicolo (FFC) per selezionare il donatore, piastre contenenti 25µg/ml di rifampicina (RIFA) e 25µg/ml di acido fusidico (FUS) per la selezione del ricevente e piastre contenenti tutti e tre gli antibiotici, alle stesse concentrazioni, per la selezione dei transconiuganti.

Negli esperimenti in cui sono stati utilizzati ceppi di *Escherichia coli*, invece: piastre di MC contenenti 20µg/ml di tetraciclina (TET) per la crescita selettiva del ceppo donatore, piastre con 50µg/ml di rifampicina (RIFA) e

50µg/ml di acido nalidixico (NAL) per il ricevente e piastre con tutti e tre gli antibiotici per la selezione dei transconiuganti. Si preparano quindi tre bottiglie distinte di terreno, e per ciascuna si aggiungono le opportune quantità di antibiotici, a partire dalle soluzioni stock.

- Una volta effettuata la semina, si procede con l'incubazione delle piastre in termostato a 37°C per 24 ore
- Conta delle colonie presenti sulle piastre per il donatore, per il ricevente e per i transconiuganti, in modo tale da risalire alla carica microbica presente nel campione iniziale, tenendo conto del fattore di diluizione e dell'aliquota piastrata
- Se si ottengono dei transconiuganti, calcolare la frequenza di trasferimento per cellula ricevente con la seguente formula:

$$F = \frac{\text{UFC/ml di transconiuganti}}{\text{UFC/ml di ricevente}}$$

### 3.4. Fase di depurazione delle cozze

Prima di effettuare gli esperimenti di coniugazione *in vivo*, circa 25 cozze venivano stabulate in una vasca contenente 22 litri di acqua di mare sintetica (ASW) sterile (salinità ~35‰). La vasca di vetro è stata precedentemente pulita con acqua e sapone, asciugata e disinfettata con alcool. L'ASW è stata aliquotata in bottiglie da 1 litro e sterilizzata in autoclave (120°C per 15 minuti). Prima di versare l'acqua nella vasca, le bottiglie sono state agitate per risospendere eventuali depositi di sali. Un aeratore è stato introdotto nella vasca per garantire un continuo apporto di ossigeno e la vasca è stata coperta con una

lastra di plexiglass per mantenere il più possibile l'ambiente sterile ed evitare un'eccessiva evaporazione (**Figura 10**).



*Figura 10; vasca con le cozze e ASW sterile*

Successivamente, le cozze sono state lasciate a depurare per due settimane, sostituendo l'acqua ogni due giorni. L'assenza di enterococchi o *Escherichia coli* nel sistema veniva verificata sacrificando un esemplare dalla vasca una volta a settimana. La cozza veniva prelevata, aiutandosi con un mestolo sterile, pulita esternamente con alcool e appoggiata su una piastra Petri anch'essa sterile. Poi, sotto cappa, veniva aperta con un bisturi, iniziando dal lato lineare della cozza, procedendo tutto intorno fino ad arrivare al muscolo adduttore. L'intero corpo molle così prelevato veniva immerso in soluzione fisiologica (SF) sterile (90 ml per 10 g di mollusco) ed omogenizzato tramite Stomacher 400 (3 minuti a 260 rpm) o Potter (**Figura 11**).



*Figura 11; prelievo e trattamento della cozza*

In seguito, l'intero omogenato veniva centrifugato (5 min a 7000 g) e risospeso in 3 ml di SF sterile (**Figura 12**). Aliquote dell'omogenato erano quindi piastrate su opportuni terreni di coltura e incubati a 37°C per 24 ore, per valutare l'eventuale crescita di colonie batteriche.



*Figura 12; omogenizzazione e centrifugazione della cozza*



### 3.5. Saggi di Bioaccumulo e Coniugazione *in vivo*

Una volta depurate, le cozze sono state suddivise nei becker (generalmente 5 esemplari per becker), ognuno con 5 litri di ASW sterile (**Figura 13**). Per ogni esperimento, ciascun becker utilizzato veniva precedentemente lavato e disinfettato con alcool; per tutta la durata dell'esperimento veniva continuamente ossigenato tramite un aeratore e coperto con un coperchio per cercare di evitare contaminazioni. Le colture batteriche del donatore e del ricevente venivano preparate partendo da una coltura o/n a temperatura ambiente in 200 ml BH broth, suddivisi in 8 falcon da 25 ml ciascuno (8 donatore + 8 ricevente). A seguito di centrifugazioni seriali (5 min a 7000g), il pellet era risospeso in 50 ml di ASW sterile, sia per il donatore che per il ricevente. Una volta inseriti gli inoculi batterici dei due ceppi nei becker, l'acqua non veniva cambiata più fino alla fine dell'esperimento. Subito dopo aver effettuato l'inoculo dei ceppi, un'aliquota di acqua veniva prelevata, diluita e piastrata su terreni selettivi per verificare l'effettiva concentrazione batterica (UFC/ml) all'inizio dell'esperimento (tempo zero, T<sub>0</sub>).



**Figura 13:** sistema di coniugazione *in vivo*

Successivamente, le cozze e un'aliquota di acqua venivano prelevate ad intervalli di tempo di 24 ore, per 3 giorni consecutivi (24, 48 e 72 ore), e piastrate su appositi terreni di coltura selettivi (SB o MC) per valutare il bioaccumulo e la presenza di eventuali transconiuganti. Per quanto riguarda le cozze, ad ogni intervallo di tempo sono state prelevate 2-3 cozze al fine di diminuire la grande variabilità dei valori di bioaccumulo, che cambiano molto da esemplare ad esemplare a seconda, ad esempio, delle dimensioni o dell'efficienza di filtrazione dell'animale. I due corpi molli, una volta estratti dalle valve, venivano uniti ed omogenati insieme, e l'omogenato piastrato come fosse un unico campione. Aliquote di acqua (1ml), e di omogenato (2500µl) e le rispettive diluizioni (spot da 10µl) sono state opportunamente piastrate. Le piastre venivano messe ad incubare a 37°C per 24h per valutare la presenza di colonie batteriche, che venivano poi contate. Ogni esperimento veniva condotto in triplicato, inoculando i ceppi in tre becker distinti. Lo stesso esperimento è stato condotto più volte variando diversi parametri quali: la temperatura del sistema (10, 15, 23°C), il tipo di ceppi ed il rapporto tra il ceppo donatore ed il ricevente (1:1, 1:10 e coniugazione 1:1 ritardata, in cui il ricevente veniva inoculato nel becker 24 ore prima del donatore). I transconiuganti ottenuti dalla coniugazione *in vivo* sono stati ripassati più volte su piastre Slanetz Bartley (SB) contenenti gli antibiotici selettivi. Quindi da 5 a 10 isolati sono stati ulteriormente analizzati per dimostrare la loro correlazione con il ceppo ricevente e l'avvenuto trasferimento dei geni di resistenza dal donatore mediante: la determinazione della sensibilità agli antibiotici tramite la tecnica della microdiluizione in brodo (MIC); la Polymerase Chain Reaction (PCR), per verificare il trasferimento dei determinanti di resistenza, e la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) per confrontare il profilo genotipico dei presunti transconiuganti con quello del donatore e del ricevente.

### 3.6. Determinazione della MIC

La sensibilità agli antibiotici dei ceppi isolati è stata valutata mediante la tecnica della microdiluzione in brodo, secondo le procedure descritte nel CLSI (CLSI M07-A10- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015). Tale tecnica permette di determinare la concentrazione minima inibente (MIC) di un antibiotico, vale a dire la concentrazione più bassa in grado di inibire completamente la crescita batterica. Si possono distinguere due fasi: la preparazione della piastra microtiter con l'allestimento delle diluizioni scalari dell'antibiotico da testare, e la preparazione dell'inoculo batterico dei ceppi in esame. Inizialmente, gli antibiotici vengono preparati ad una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata che si vuole saggiare, diluendo la soluzione stock di antibiotico in un volume adeguato di brodo Mueller Hinton II. Con una pipetta multicanale si inoculano 50 $\mu$ l di brodo MH II in tutti i pozzetti della piastra, esclusa la prima colonna. Quindi la soluzione di antibiotico precedentemente preparata viene distribuita (50 $\mu$ l per pozzetto) nella prima e seconda colonna della piastra. Quindi, a partire dalla seconda colonna, si prelevano 50 $\mu$ l e si inoculano nei pozzetti della colonna successiva per allestire diluizioni scalari dell'antibiotico lungo ogni riga della piastra. Si procede allo stesso modo per tutte le diluizioni, fino alla penultima colonna. L'ultima colonna della piastra viene lasciata senza antibiotico, come controllo di crescita dei ceppi. I ceppi da testare dopo crescita overnight a 37°C in BH brodo vengono standardizzati in brodo MH II, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro aggiustando la densità ottica delle colture batteriche ad una densità di 0,1 (lunghezza d'onda  $\lambda = 625$  nm) che corrisponde ad una concentrazione di circa 10<sup>8</sup> UFC/ml. La sospensione batterica viene ulteriormente diluita 1:100 e utilizzata per inoculare 50 $\mu$ l in tutti i pozzetti della

piastra precedentemente allestita. Ad ognuna delle righe orizzontali corrisponde un ceppo da testare, che in ciascun pozzetto si trova a contatto con diverse concentrazioni di antibiotico. L'inoculo batterico finale presente in ciascun pozzetto sarà all'incirca pari a  $5 \times 10^5$  UFC/ml. La microtiter viene infine incubata per 24 ore a 37 °C e la minima concentrazione inibente viene determinata valutando la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita batterica. Per l'interpretazione dei risultati si è fatto riferimento ai valori riportati nelle tabelle del CLSI, mentre per valutare l'attendibilità di ogni esperimento sono stati controllati i valori di MIC ottenuti con i ceppi di controllo, che vengono testati nella microtiter parallelamente ai ceppi in esame. Se i valori di MIC dei ceppi di controllo ricadono nei range corrispondenti, riportati nelle tabelle di riferimento del CLSI, le MIC dei ceppi esaminati possono essere determinate e interpretate.

### **3.7. Estrazione del DNA totale batterico**

Prima di procedere con i saggi di PCR, è stato necessario eseguire l'estrazione del DNA totale batterico tramite l'utilizzo del kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma). I ceppi batterici erano inoculati in Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37°C; le brodoculture così ottenute erano prima centrifugate (13.000 g per 2 minuti) e poi risospese in 200µl di Lysozyme Solution contenente lisozima (Sigma) alla concentrazione finale di 45 mg/ml. Seguiva una incubazione a 37°C per 1 ora. Al termine dell'incubazione, venivano aggiunti 200µl di Lysis Solution e 20µl di Proteinasi K (20mg/ml) (Sigma), per la digestione delle proteine. I campioni erano quindi mantenuti a 55°C per 10 minuti. Successivamente, alla sospensione venivano aggiunti 200µl di etanolo assoluto; dopo aver mescolato

per inversione i campioni, l'intera soluzione veniva trasferita nelle colonnine inserite in provette eppendorf da 1,5 ml e centrifugate a 6.500g per 1 minuto. Dopo aver eliminato l'eluito, si effettuavano due lavaggi aggiungendo alle colonnine 500µl di Wash Solution. Dopo il primo lavaggio si centrifugava a 6.500g per 1 minuto; dopo il secondo a 12.000g per 3 minuti. Le colonnine erano quindi trasferite in nuove eppendorf e si aggiungevano 200µl di Elution Solution. Seguiva una centrifugazione a 6.500g per 1 minuto. L'eluizione veniva ripetuta una seconda volta e la soluzione di DNA risultante era conservata a -20°C.

### **3.8. Saggi di PCR**

La PCR (*polymerase chain reaction*) è una tecnica usata in biologia molecolare, che consente di ottenere migliaia di copie di uno specifico tratto di DNA di cui si conosce la sequenza nucleotidica iniziale e terminale. A questo scopo, per le reazioni di PCR, il DNA target viene aggiunto ad una miscela di reazione costituita da un tampone contenente desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, specifici oligonucleotidi che fungono da innesco della reazione (*primer*) e la Taq polimerasi. I campioni vengono quindi caricati in un termociclatore in cui avviene la reazione di amplificazione del DNA. Inizialmente, i campioni vengono esposti ad una temperatura compresa tra 94 e 99°C (fase di *denaturazione*), quindi abbassata a 40-55°C circa, al fine di permettere l'appaiamento dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*), e infine, la temperatura viene alzata fino a 65-72°C, con lo scopo di massimizzare l'azione della Taq polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di *estensione*). Il ciclo descritto viene

ripetuto, generalmente, per circa 30-40 volte. I saggi di PCR sono stati eseguiti tramite un termociclatore T-Personal thermocycle (Biometra, Germany). Per ottenere la maggior parte degli amplificati è stata utilizzata la DreamTaq polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). È stata effettuata l'analisi di PCR, utilizzando la stessa miscela di reazione (**Tabella 3**), sia per l'identificazione a livello di specie dei ceppi di *Enterococcus spp.*, mediante amplificazione del gene codificante la ligasi specie-specifica (**Tabella 4**), sia per la ricerca di determinati geni di resistenza negli enterococchi e nei rispettivi transconiuganti (**Tabelle 5 e 6**).

*Tabella 3; miscela di reazione utilizzata per le PCR*

<b>Reagenti (Concentrazione iniziale)</b>	<b>Volume in <math>\mu</math>l (Concentrazione finale)</b>
H2O	<b>38.25</b>
PCR Buffer(10x)	<b>5 (1x)</b>
dNTPs(10mM)	<b>1.0 (0.2mM)</b>
Primer Forward (100 $\mu$ M)	<b>0.25 (0.5<math>\mu</math>M)</b>
Primer Reverse (100 $\mu$ M)	<b>0.25 (0.5<math>\mu</math>M)</b>
DreamTaq (5U/ $\mu$ L)	<b>0.25 (1.25U)</b>
(DNA lisato)	<b>5</b>
<b>Volume totale</b>	<b>50</b>

**Tabella 4;** primers utilizzati per la PCR della ligasi di *E. faecium*, dei ceppi KSEG1, KSEG2, KSEG3, KSEG7, KHEG2, BSEG7.

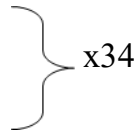
<b>Primer</b>	<b>Sequenza nucleotidica (5'-3')</b>	<b>Lunghezza amplificato</b>	<b>Programma di amplificazione</b>
<b>M1</b>	TAGAGACATTGAATATGCC	550 bp  Dutka-Malen et al, 1995	95 °C x 5 min 95 °C x 1 min 54°C x 1 min 72 °C x 1 min 72 °C x 7 min } x30
<b>M2</b>	TCGAATGTGCTACAATC		

**Tabella 5;** primers utilizzati per la PCR del gene *vanA*, dei ceppi KSEG1, KSEG2, KSEG3, KSEG7, KHEG2, BSEG7.

<b>Primer</b>	<b>Sequenza nucleotidica (5'-3')</b>	<b>Lunghezza amplificato</b>	<b>Programma di amplificazione</b>
<b>VanA1</b>	GGGAAAACGACAATTGC	732 bp  Dutka-Malen et al, 1995	94 °C x 4 min 94 °C x 30 sec 60 °C x 30 sec 72 °C x 1 min 72 °C x 7 min } x30
<b>VanA2</b>	GTACAATGCGGCCGTTA		

I controlli positivi: ATTC 29212 e LSEF2.

**Tabella 6;** primers utilizzati per l'identificazione del gene *poxA* nei ceppi *Enterococcus spp.*

<b>Primer</b>	<b>Sequenza nucleotidica (5'-3')</b>	<b>Lunghezza amplificato</b>	<b>Programma di amplificazione</b>
<b>PoxA FW</b>	gaacgcttgagatatttcgacttc	778 bp	94 °C x 1 min 94 °C x 1 min 54 °C x 2 min 72 °C x 3 min 72 °C x 7 min 
<b>PoxA RV</b>	ctggactgagaatacccatc	Brenciani et al., 2019	

I prodotti delle amplificazioni sono stati separati in gel di agarosio all'1% contenente 1X di Green Gel (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia) mediante camera elettroforetica in tampone TAE 1X (Tris Acetato EDTA) e applicando una corrente di 80 Volt per circa 1 ora. Come pesi molecolari standard sono stati utilizzati: GeneRuler 100b DNA Ladder e GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).



### 3.9. PFGE

La Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) è una tecnica di tipizzazione che è stata utilizzata per confermare la veridicità dei transconiuganti andando a confrontare i profili ottenuti in seguito alla restrizione con l'enzima SmaI con quelli del donatore e del ricevente. La digestione con la S1-nucleasi è stata invece utilizzata per definire il numero e le dimensioni dei plasmidi presenti nei ceppi e negli eventuali transconiuganti.



*Figura 14; apparecchiatura per la PFGE*

La tecnica è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Ripa et al. (Ripa et al., 2001). In breve, i ceppi venivano fatti crescere overnight in BHI e diluiti fino a raggiungere una concentrazione di DNA approssimativa di 10 $\mu$ g/ml. A questo punto 1 ml della sospensione veniva centrifugato e lavato con 0,5 ml di TEN (Tris EDTA NaCl) Buffer. Il pellet risospeso in 0,5ml di TEN Buffer era mescolato con un volume identico di low-melting-point agarose (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1,6% e introdotto in appositi stampi (plug-mold) per la creazione delle plug. Una volta solidificate, le plug venivano prima incubate per 24 ore a 37°C in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1mg/ml) e RNasi A (50 $\mu$ g/ml) (Sigma) e poi per 24 ore a 50°C in 3 ml di Digestion Buffer contenente proteinasi K (0,5 $\mu$ g/ml). Le plug venivano quindi

lavate 3 volte in 10 ml di TE (Tris EDTA) Buffer. Metà plug veniva incubata overnight con 30 U di SmaI o S1-nucleasi (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. La digestione veniva bloccata aggiungendo 1 ml di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) 0,5 M. Ciascuna plug veniva posta poi su un pettine e inclusa all'interno di un gel di agarosio (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 (Biorad) con le seguenti condizioni per SmaI e S1, rispettivamente: tempo di corsa 22 ore, campo elettrico di 6 V/cm, switch iniziale 1 secondo, switch finale 30 secondi, ramping factor lineare; tempo di corsa 18 ore, campo elettrico di 6 V/cm, switch iniziale 0,5 secondi, switch finale 22 secondi, ramping factor lineare. Al termine della corsa il gel era immerso in una soluzione acquosa di bromuro d'etidio (0,5µg/ml) e le bande di DNA venivano visualizzate al trans-illuminatore. Come marker sono stati utilizzati il Low Range PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, USA) e il Lambda Marker (Promega, Madison, USA).

## 4. RISULTATI

In questo studio sono stati analizzati 55 ceppi di enterococco selezionati da una collezione di 174 ceppi precedentemente isolati da campioni di sedimento, acqua e zooplancton ottenuti da diverse campagne di campionamento, effettuate nell'area costiera di Ancona.

Le analisi di sensibilità agli antibiotici avevano evidenziato una maggior presenza di isolati antibiotico-resistenti soprattutto nei campioni di sedimento (32), rispetto ai campioni di acqua (3) e zooplancton (1). In particolare, si osservava una maggiore frequenza di resistenza alla gentamicina (45% dei ceppi), seguita dalla resistenza all'ampicillina (32%), al florfenicolo (28%), alla daptomicina e alla vancomicina (circa il 3%). La presenza in ambiente marino di enterococchi resistenti e, in particolare, resistenti ad antibiotici estremamente importanti in ambiente ospedaliero, come gli oxazolidinoni e la vancomicina, ha suscitato il nostro interesse. In questo studio, sono stati quindi studiati più a fondo e caratterizzati i ceppi di *Enterococcus* spp. resistenti al florfenicolo (49) e alla vancomicina (6).

### 4.1. Identificazione degli enterococchi resistenti al florfenicolo e ricerca dei geni di resistenza

Le analisi di sensibilità agli antibiotici effettuate sui ceppi ottenuti dai campionamenti precedenti avevano evidenziato la presenza di un totale di 49 ceppi resistenti al florfenicolo, di cui 41 isolati da sedimento e 8 da zooplancton. I ceppi sono stati quindi sottoposti all'analisi mediante SmaI-PGFE per valutare la loro correlazione genetica ed escludere gli isolati identici.

La PFGE metteva in evidenza la presenza di 7 pulsotipi (profilo di PFGE) differenti, per cui le analisi successive sono state effettuate su 7 isolati selezionati, ognuno nell'ambito di ciascun pulsotipo. Questi ceppi sono stati innanzitutto identificati a livello di specie ed analizzati mediante PCR per la presenza dei geni di resistenza al florfenicolo: *optrA*, *poxtA* e *cfr*.

In particolare, 3 ceppi erano stati identificati come *E. faecium* (KSEF3, LSEF2 e NSEF3), 3 come *E. hirae* (PSEF5, QZEF2 e QZEF6) mentre uno solo come *E. faecalis* (JSEF3). Per quanto riguarda l'analisi genotipica, tutti gli isolati possedevano il gene *poxtA*, tranne JSEF3 che portava il gene *optrA*. Nessun isolato risultava positivo per il gene *cfr*. I risultati sono riassunti in **Tabella 7**.

**Tabella 7;** analisi genotipica (PCR) e fenotipica (MIC) degli enterococchi isolati, + = presenza del gene di resistenza, - = assenza del gene di resistenza, *ffc* = florfenicolo, *CHL* = cloramfenicolo. *lzd* = linezolid, *TZD* = tedizolid, *tet* = tetraciclina, *R* = resistente

Isolato	Specie	Campione	Analisi genotipica (PCR)			Analisi fenotipica (MIC, µg/ml)				
			<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>poxtA</i>	<i>ffc</i>	<i>CHL</i>	<i>lzd</i>	<i>TZD</i>	<i>tet</i>
JSEF3	<i>E. faecalis</i>	sedimento	+	-	-	128 R	128 R	4	4 R	128 R
KSEF3	<i>E. faecium</i>	sedimento	-	-	+	64 R	16	8 R	3 R	128 R
LSEF2	<i>E. faecium</i>	sedimento	-	-	+	32 R	16	8 R	2 R	128 R
NSEF3	<i>E. faecium</i>	sedimento	-	-	+	64 R	32 R	2	2 R	128 R
PSEF5	<i>E. hirae</i>	sedimento	-	-	+	64 R	64 R	8 R	2 R	>128 R
QZEF2	<i>E. hirae</i>	zooplancton	-	-	+	64 R	64 R	8 R	3 R	128 R
QZEF6	<i>E. hirae</i>	zooplancton	-	-	+	64 R	64 R	8 R	2 R	128 R

## 4.2. Identificazione degli enterococchi resistenti alla vancomicina e ricerca dei geni di resistenza

Le analisi di sensibilità agli antibiotici effettuate sui ceppi ottenuti dai campionamenti precedenti avevano evidenziato la presenza di un totale di 6 ceppi resistenti alla vancomicina, di cui 5 isolati da sedimento e 1 dall'acqua. Oltre alla resistenza alla vancomicina, tutti i ceppi, eccetto BSEG7, erano anche resistenti alla gentamicina e all'ampicillina ed erano quindi multiresistenti (MDR) (Tabella 8).

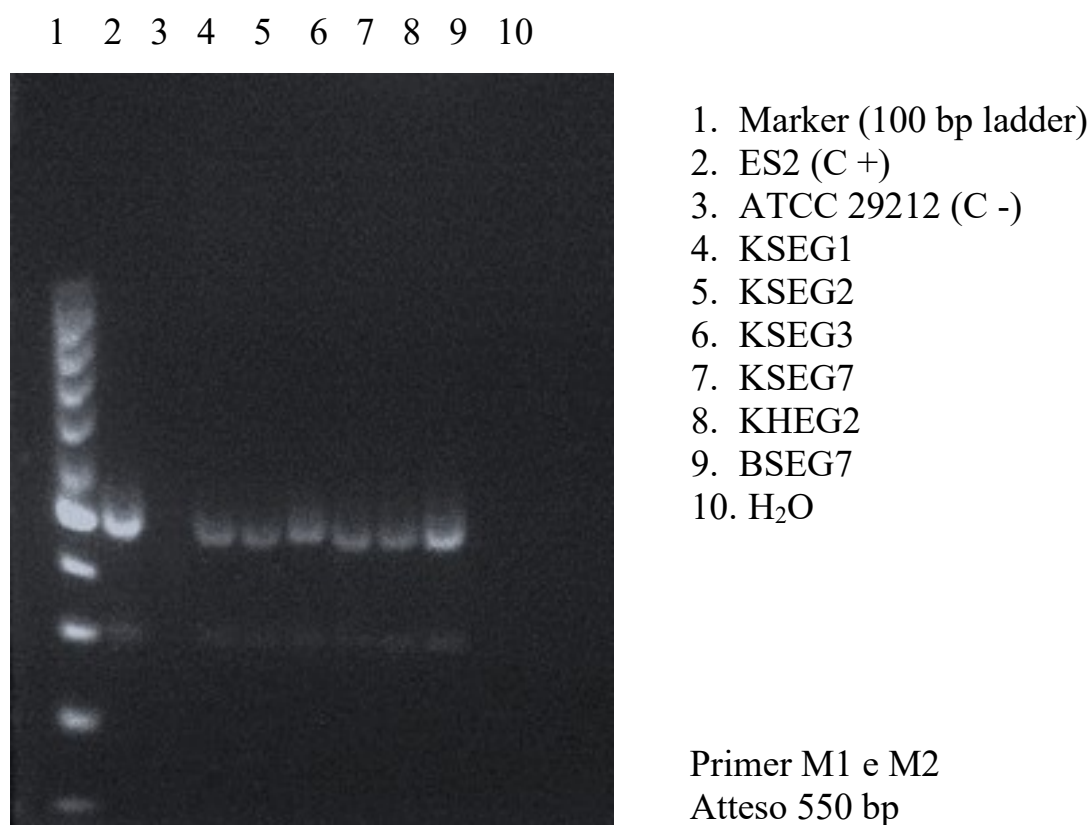
**Tabella 8;** Caratteristiche dei ceppi vancomicino-resistenti, GENTA = gentamicina, AMP = ampicillina, DAPTO = daptomicina, VANCO = vancomicina, FFC = florfenicolo, S = sensibile, R = resistente

Isolato	Specie	Campione	MIC (µg/ml)				
			GENTA	AMP	DAPTO	VANCO	FFC
KSEG1	<i>E. faecium</i>	sedimento	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KSEG2	<i>E. faecium</i>	sedimento	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KSEG3	<i>E. faecium</i>	sedimento	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KSEG7	<i>E. faecium</i>	sedimento	> 1024 R	> 32 R	S	> 128 R	S
KHEG2	<i>E. faecium</i>	acqua	> 1024 R	> 128 R	S	128 R	S
BSEG7	<i>E. faecium</i>	sedimento	S	S	S	64 R	S

I sei ceppi sono stati identificati a livello di specie mediante amplificazione del gene codificante la ligasi specie-specifica, *ddlE.faecium*. Le analisi di PCR evidenziavano la presenza del gene *ddlE.faecium* in tutti i ceppi, dimostrando la loro appartenenza alla specie *Enterococcus faecium* (Tabella 9) e (Figura 15).

**Tabella 9;** PCR del gene codificante la ligasi specie-specifica, *ddl<sub>E.faecium</sub>*.

Isolato						
	KSEG1	KSEG2	KSEG3	KSEG7	KHEG2	BSEG7
<b>PCR</b> <i>(ddl<sub>E.faecium</sub>)</i>	+	+	+	+	+	+

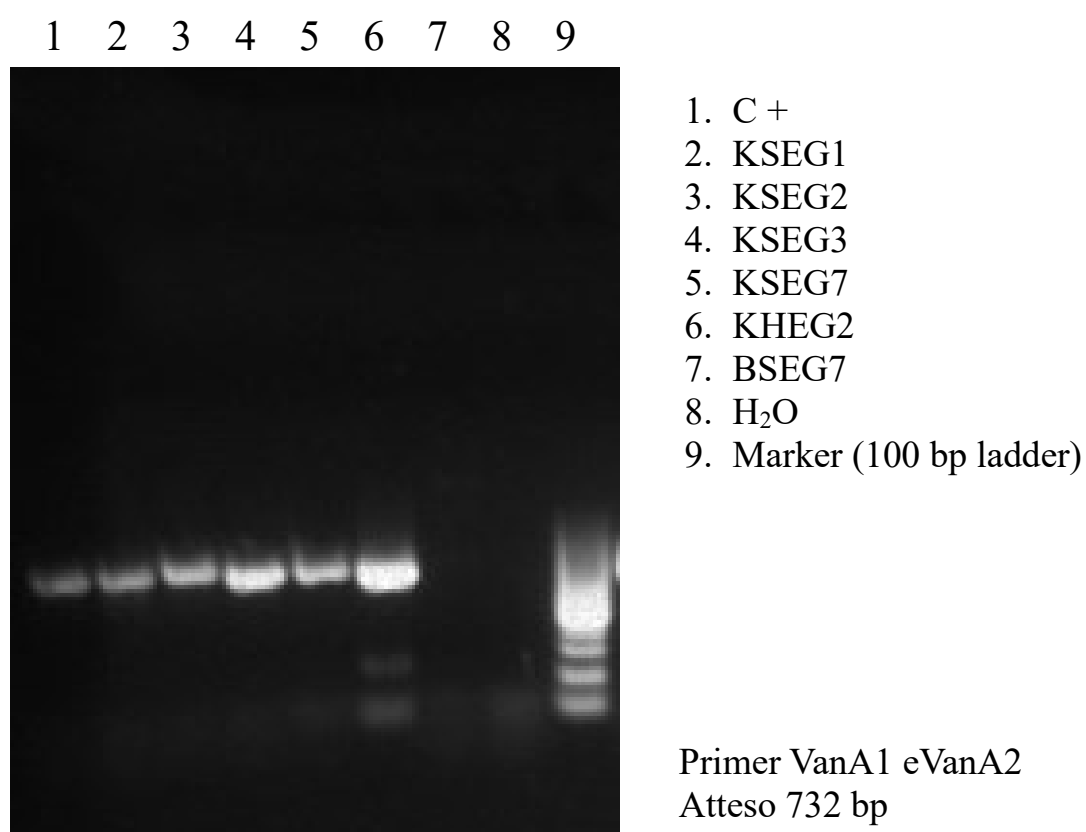


**Figura 15;** elettroforesi in gel d'agarosio (1%) degli amplificati ottenuti dalla PCR specie-specifica per l'identificazione dei 6 ceppi di enterococco vancomicino-resistenti.

Successivamente, sempre mediante PCR, è stata dimostrata la presenza del gene di resistenza *vanA* in tutti i ceppi, ad eccezione di *E. faecium* BSEG7 (**Figura 16**). I risultati sono riassunti in **Tabella 10**.

*Tabella 10; PCR del gene di resistenza vanA*

Isolato						
	KSEG1	KSEG2	KSEG3	KSEG7	KHEG2	BSEG7
PCR ( <i>vanA</i> )	+	+	+	+	+	-



*Figura 16; elettroforesi in gel d'agarosio (1%) degli amplificati ottenuti dalla PCR per il gene vanA nei 6 ceppi di enterococco vancomicino-resistenti.*

### 4.3. Coniugazioni *in vitro*

Precedenti saggi di coniugazione erano stati effettuati per valutare il trasferimento dei geni di resistenza *optrA* e *poxxA*, da parte dei sei enterococchi florfenicolo-resistenti al ceppo ricevente *E. faecium* 64/3.

Tutti gli isolati, ad eccezione di JSEF3, avevano trasferito con successo il gene di resistenza *poxxA* con frequenze comprese tra  $6,5 \times 10^{-1}$  e  $3 \times 10^{-6}$ . Le MIC e i genotipi sia per i donatori che per i transconiuganti selezionati, e le frequenze di trasferimento sono indicate nella **Tabella 11**.

La frequenza più alta era osservata nel trasferimento intraspecifico del gene *poxxA* da *E. faecium* LSEF2 al ceppo *E. faecium* 64/3 ( $6.5 \times 10^{-1}$ ), per cui questa coppia di batteri è stata scelta per effettuare gli esperimenti di coniugazione *in vivo*.

**Tabella 11;** MIC e genotipi per i donatori e per i transconiuganti selezionati e frequenze di trasferimento. FFC = florfenicolo, LZD = linezolid. NR = non rilevabile.

Donatore			Ricevente	Frequenza di trasferimento	Transconiuganti			
	MIC (mg/L)		LZD genotipo di resistenza		MIC (mg/L)		genotipo	
	FFC	LZD			FFC	LZD		
<i>E. faecalis</i> JSEF3	128	4	<i>optrA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	NR	-	-	-
<i>E. faecium</i> KSEF3	64	8	<i>poxxA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	$5 \times 10^{-5}$	64	4	<i>poxxA</i>
<i>E. faecium</i> LSEF2	32	8	<i>poxxA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	$6,5 \times 10^{-1}$	64	4	<i>poxxA</i>



<i>E. faecium</i> NSEF3	64	2	<i>poxTA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	$1,1 \times 10^{-1}$	32	2	<i>poxTA</i>
<i>E. hirae</i> PSEF5	64	4	<i>poxTA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	$7,5 \times 10^{-5}$	64	4	<i>poxTA</i>
<i>E. hirae</i> QZEF2	64	8	<i>poxTA</i>	<i>E. faecium</i> 64/3	$3 \times 10^{-6}$	64	4	<i>poxTA</i>

#### 4.4. Bioaccumulo e Coniugazione *in vivo*

Nel periodo da marzo a dicembre 2021 sono stati eseguiti diversi esperimenti di coniugazione *in vivo*, utilizzando i mitili come modello animale. Per ciascun esperimento è stata effettuata inizialmente una fase di depurazione, della durata di due settimane, per ridurre la carica batterica eventualmente presente nei tessuti animali. Dopo la depurazione, veniva verificata l'assenza di enterococchi nei molluschi seminando aliquote degli omogenati di cozza su piastre di SB. In un primo momento, sono state testate diverse condizioni per mettere a punto il protocollo di coniugazione *in vivo*, che non era stato mai effettuato in precedenza.

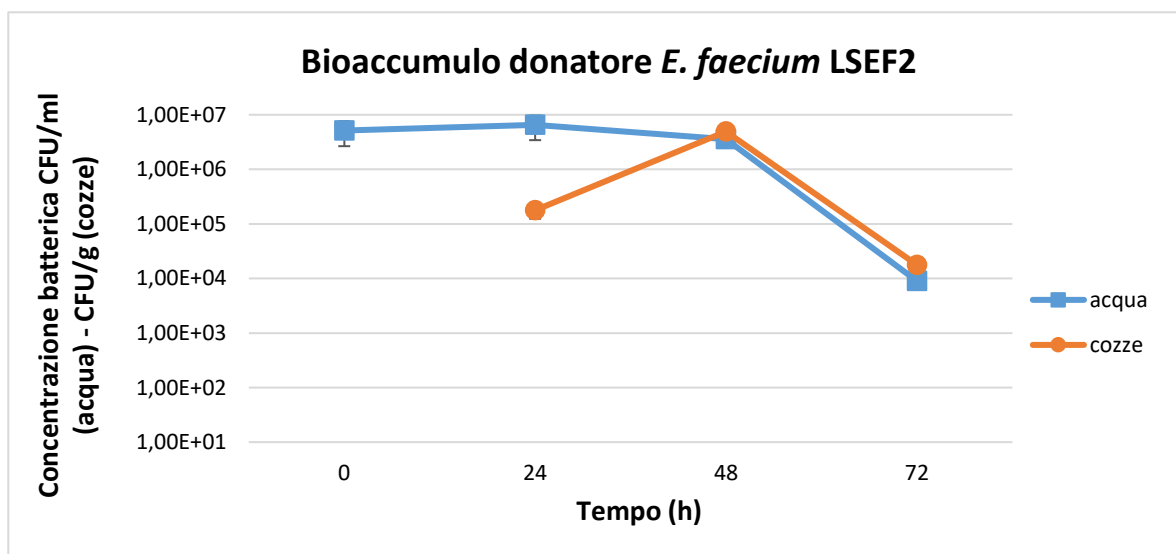
##### 4.4.1. Bioaccumulo

Per prima cosa, è stata valutata la capacità di bioaccumulo delle cozze e la capacità dei ceppi utilizzati di sopravvivere in acqua. Era necessario, infatti, capire la quantità di batteri filtrati dall'animale nel tempo, e la durata della loro vitalità all'interno della cozza, per poter stabilire la durata ottimale dell'esperimento e l'intervallo di tempo con una maggiore probabilità di ottenere transconiuganti nei tessuti della cozza.

- **Bioaccumulo del ceppo donatore *E. faecium* LSEF2**

Per valutare il bioaccumulo del ceppo donatore nelle cozze tre becker, contenenti ognuno 5 mitili in 5 litri di ASW sterile, venivano inoculati con la coltura batterica O/N risospesa in 50 ml di ASW sterile. Al tempo 0 (subito dopo l'inoculo) e poi ad intervalli di 24h, aliquote di acqua ed un esemplare venivano prelevati da ciascun becker per determinare il numero di cellule batteriche vitali (UFC/ml) e monitorare il variare della concentrazione batterica nel sistema nel tempo. Nell'acqua, la concentrazione batterica del ceppo donatore rimaneva costante, attorno a  $5 \times 10^6$  cfu/ml, per i primi 2 giorni; dal secondo al terzo giorno si osservava una riduzione di circa 2,5 log, per poi rimanere stabile attorno a  $1 \times 10^4$  cfu/ml fino a 6 giorni (144h).

Nelle cozze, dopo 24h dall'inoculo, la concentrazione batterica era circa 1,5-2 log inferiore ( $1 \times 10^5$  cfu/g) rispetto a quella che si osservava in acqua, ma raggiungeva il massimo a 48h ( $\sim 5 \times 10^6$  cfu/g), pari alla concentrazione nell'acqua. Successivamente, come accadeva in acqua, la concentrazione batterica si riduceva a  $1 \times 10^4$  cfu/g a 72h e continuava a calare (di mezzo log) raggiungendo la concentrazione di circa  $5 \times 10^3$  cfu/g a 6 giorni dall'inoculo (Figura 17).



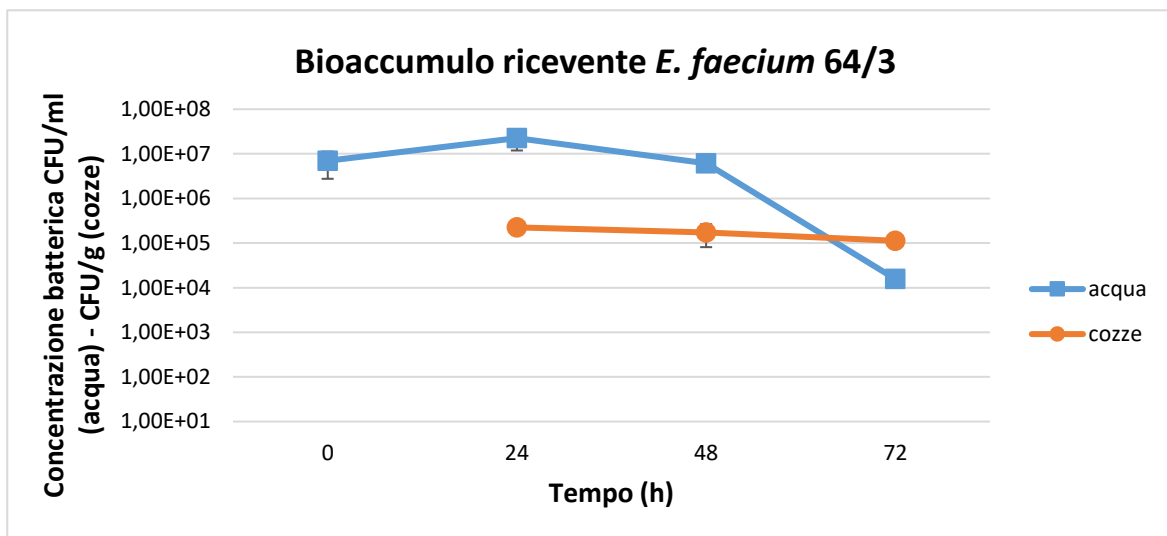
	0h			24h			48h			72h			144h (6d)		
	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds
acqua (1a)	3,51E+06			5,60E+06			4,30E+06			9,00E+03			1,70E+04		
	3,91E+06			4,00E+06			4,00E+06			8,00E+03			2,50E+04		
	8,00E+06	5,14E+06	2,48E+06	1,00E+07	6,53E+06	3,11E+06	2,00E+06	3,58E+06	1,06E+06	1,00E+04	9,00E+03	1,00E+03	2,40E+04	2,77E+04	1,48E+04
							4,00E+06						4,00E+04		
													1,00E+04		
cozze (1c)	0,00E+00			1,90E+05			4,10E+06			1,90E+04			5,75E+03		
				2,20E+05			3,60E+06			2,20E+04			3,75E+03		
		0,00E+00		1,00E+05	1,78E+05	5,32E+04	5,00E+06	4,93E+06	1,50E+06	2,00E+04	1,78E+04	5,32E+03	7,50E+03	5,50E+03	1,57E+03
				2,00E+05			7,00E+06			1,00E+04			5,00E+03		

**Figura 17;** bioaccumulo del ceppo donatore *E. faecium* LSEF2

- **Bioaccumulo del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3**

Anche per il ceppo ricevente è stato allestito l'esperimento di bioaccumulo in triplicato e sono state allestite delle conte vitali come descritto per il ceppo donatore. Nell'acqua la concentrazione del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3 rimaneva stabile attorno a  $1 \times 10^7$  cfu/ml per i primi 2 giorni dopo l'inoculo, per poi calare a circa  $1 \times 10^4$  cfu/ml tra il secondo e il terzo giorno e stabilizzarsi a questa concentrazione fino al sesto giorno.

Nelle cozze la concentrazione batterica dopo 24h dall'inoculo era inferiore a quella presente in acqua, come osservato per il ceppo donatore (attorno a  $1 \times 10^5$  cfu/g) e restava stabile dopo 48 e 72 ore dall'inoculo. A 72h invece, è circa 1 log superiore rispetto a quella nell'acqua. Da 72 a 144h la concentrazione crollava di circa 3 log (fino a  $2 \times 10^1$  cfu/g) (**Figura 18**).



	0h			24h			48h			72h			144h (6d)		
	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds	valori	media	ds
acqua (2a)	1,00E+07			1,50E+07			5,50E+06			1,30E+04			2,60E+04		
	4,00E+06			3,00E+07			6,20E+06			1,40E+04			2,30E+04		
		7,00E+06	4,24E+06		2,25E+07	1,06E+07		4,00E+06	6,18E+06	2,10E+06	2,00E+04	1,57E+04	3,79E+03	3,10E+04	9,67E+03
								9,00E+06						5,00E+04	
														3,00E+04	
cozze (2c)				1,90E+05			2,00E+05			1,40E+05			1,00E+01		
				2,10E+05			2,90E+05			1,10E+05			1,00E+01		
		0,00E+00	0,00E+00	3,00E+05	2,25E+05	5,07E+04	1,00E+05	1,73E+05	9,14E+04	1,00E+05	1,13E+05	1,89E+04	5,00E+01	2,33E+01	2,31E+01
				2,00E+05			1,00E+05			1,00E+05					

**Figura 18;** bioaccumulo del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3

I valori di bioaccumulo batterico all'interno delle cozze davano quindi risultati diversi, ma in ogni caso sembrava che la maggiore venisse raggiunta nell'animale entro le 72h dall'inoculo, dopo di che la concentrazione batterica iniziava a diminuire. Questo ci suggeriva che la probabilità che avvenisse uno scambio genetico tra i batteri filtrati dalla cozza e accumulati nei suoi tessuti fosse maggiore nei primi 3 giorni dopo l'inoculo. Tutti gli esperimenti successivi sono stati quindi eseguiti con una durata massima di 72h. La concentrazione batterica nell'acqua seguiva un andamento altamente ripetibile: più o meno stabile fino a 48h, per poi calare successivamente. Abbiamo quindi voluto verificare se questa riduzione fosse una conseguenza dell'attività filtrante dei mitili o dovuta alla morte delle cellule batteriche in acqua.

#### 4.4.2. Sopravvivenza batterica in acqua

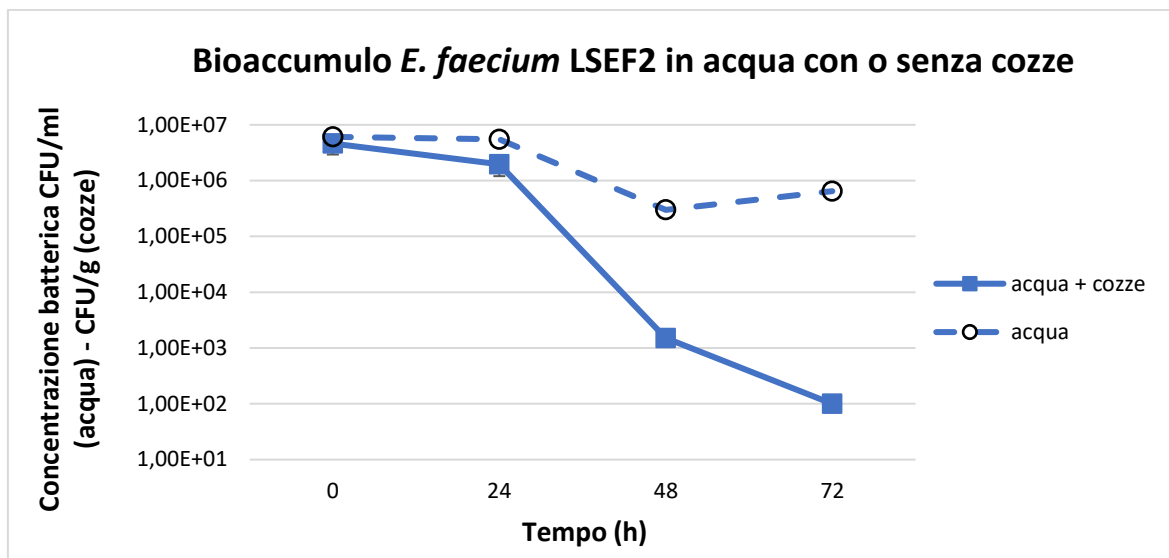
Per valutare se il calo della concentrazione batterica in acqua, evidenziato nel precedente esperimento, fosse il risultato dell'attività di filtrazione delle cozze o di una ridotta vitalità dei microrganismi col passare del tempo, abbiamo monitorato per 72 l'andamento della concentrazione batterica in acqua (del ceppo donatore *E. faecium* LSEF2) in presenza e in assenza di cozze.

- ***Andamento della carica batterica in acqua in presenza di cozze.***

In presenza di cozze (linea continua), la concentrazione batterica nell'acqua rimaneva costante attorno a  $5 \times 10^6$  cfu/ml a 24 ore dall'inoculo; dopo 48 ore calava di circa 3 log ( $1 \times 10^3$  cfu/ml) e a 72 ore diminuiva di un ulteriore log ( $1 \times 10^2$  cfu/ml).

- ***Andamento della carica batterica in acqua in assenza di cozze***

In assenza di cozze (linea tratteggiata), la concentrazione batterica nell'acqua rimaneva stabile nelle prime 24 ore ( $5 \times 10^6$  cfu/ml), per poi calare di 1 solo log ( $2-5 \times 10^5$  cfu/ml) a 48 ore e rimanere costante a questa concentrazione fino a 72 ore (**Figura 19**).



*Figura 19; andamento della carica batterica in acqua in assenza o in presenza di cozze*

Il confronto tra la concentrazione batterica in acqua nelle due condizioni suggeriva che in assenza di cozze la carica batterica rimaneva abbastanza stabile a 72 ore dall'inoculo, seppure con una leggera riduzione. Mentre in presenza di cozze la concentrazione batterica in acqua diminuiva drasticamente fino a 4 log a 72 ore, dimostrando che la riduzione della carica batterica in acqua non era correlata alla sopravvivenza batterica, ma all'attività di filtrazione dei mitili. Tuttavia, non si nota contemporaneamente un aumento nel tempo della concentrazione batterica nelle cozze: al contrario, l'accumulo batterico all'interno dei mitili diminuisce nel tempo.

#### **4.4.3. Saggi di coniugazione *in vivo*: rapporto donatore/ricevente**

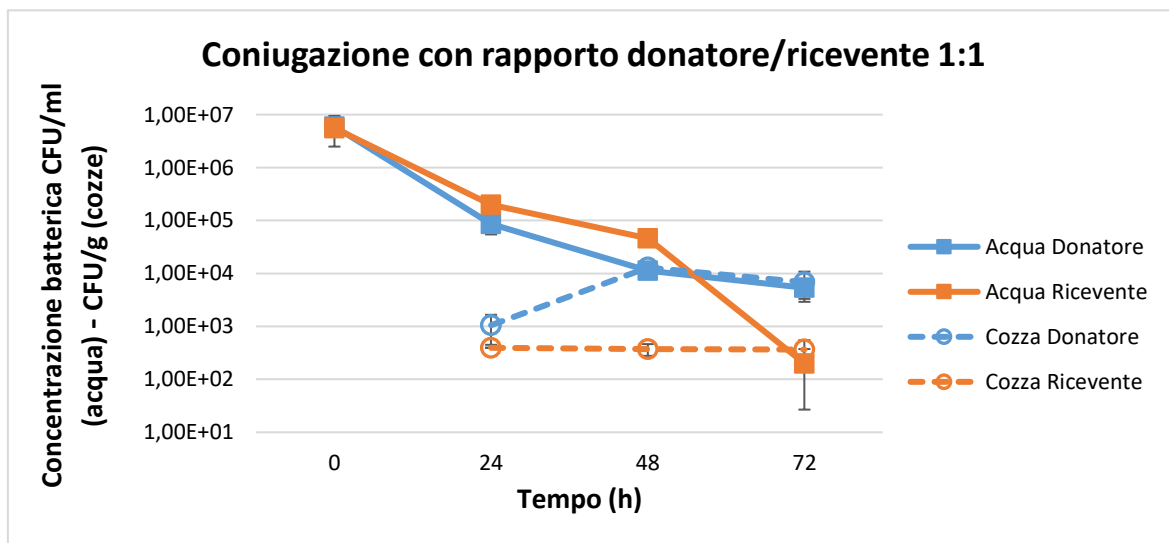
Una volta valutati i dati di bioaccumulo, sono stati effettuati diversi esperimenti di coniugazione, variando le quantità di donatore e ricevente inoculate nello stesso becker, per valutare eventuali differenze nella frequenza di coniugazione. Un primo esperimento è stato eseguito inoculando in ciascun

becker la stessa quantità dei due ceppi (rapporto donatore/ricevente 1:1); un secondo esperimento inoculando la stessa quantità, ma ritardando di 24 ore l'inoculo del donatore (rapporto donatore/ricevente 1:1 ritardata); e, infine, un ultimo esperimento in cui la quantità del ceppo ricevente era 10 volte maggiore rispetto a quella del donatore (rapporto donatore/ricevente 1:10).

- **Coniugazione con rapporto donatore/ricevente 1:1**

Nell'acqua, la concentrazione del donatore e del ricevente segue lo stesso andamento per le prime 48 ore (calo di circa 2 log). Tra le 48 e le 72 ore la concentrazione del donatore si stabilizza su  $10^4$  cfu/ml, mentre il ricevente cala di ulteriori 2 log.

Nelle cozze i due ceppi hanno un andamento differente: il ricevente rimane stabile sulla concentrazione di circa  $3 \times 10^2$  cfu/g, mentre il donatore aumenta di 1 log tra le 24 e le 48 ore e rimane stabile a circa  $1 \times 10^4$  cfu/g (**Figura 20**). Seminando sia l'acqua che l'omogenato di cozza su SB contenente tutti gli antibiotici per la selezione dei transconiuganti non si è avuta alcuna crescita.

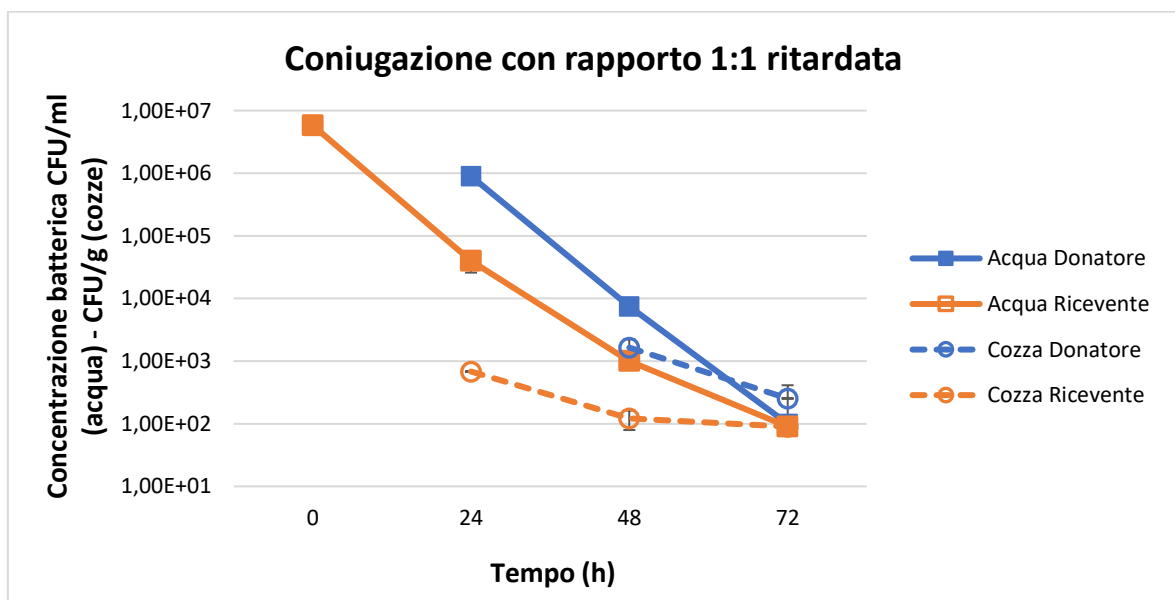


*Figura 20; coniugazione E. faecium 1:1*

- **Coniugazione con rapporto donatore/ricevente 1:1 ritardata (inoculo del donatore ritardata di 24 h).**

Nell'acqua, le concentrazioni di donatore e ricevente (pur partendo da due tempi diversi) seguono esattamente lo stesso andamento, calando di 3,5-4 log in 48 ore (da  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^3$  cfu/ml per il donatore, da  $9 \times 10^5$  a  $9 \times 10^1$  cfu/ml per il ricevente).

Nelle cozze, dopo 24 ore dall'inoculo in acqua del solo ceppo ricevente, la concentrazione batterica è pari a circa  $1 \times 10^3$  cfu/g e, a 48 ore, intorno a  $1 \times 10^2$  cfu/g, stabilizzandosi su questo valore. Il donatore invece, inoculato nell'acqua in ritardo, è presente al tempo  $T_{48}$  a concentrazioni di circa  $1 \times 10^3$  cfu/g. Anche in questo caso non sono stati ottenuti transconiuganti. Il ritardo nell'inoculo del donatore ha dato 24 ore in più di tempo al ricevente per accumularsi; tuttavia, sembra che nel tempo il bioaccumulo all'interno dei mitili cali invece di aumentare, probabilmente dovuto alla loro attività di filtrazione e/o sistema immunitario (**Figura 21**).



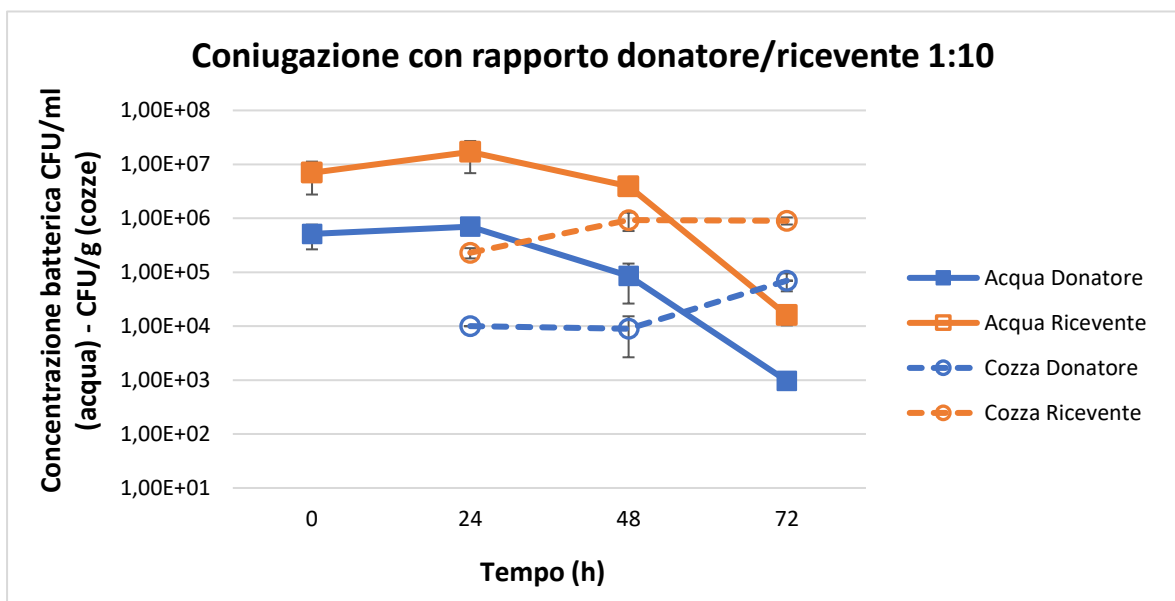
**Figura 21;** coniugazione *E. faecium* 1:1 ritardata



- **Coniugazione con rapporto donatore/ricevente 1:10**

Nell'acqua, donatore e ricevente (pur partendo da due concentrazioni diverse) seguono lo stesso andamento già osservato negli altri esperimenti. In questo caso però, il calo della concentrazione sembra iniziare già tra le 24 e le 48 ore dopo l'inoculo, per poi attestarsi a valori piuttosto a 72 ore ( $10^4$  cfu/ml per il ricevente e  $10^3$  cfu/ml per il donatore).

Nelle cozze, sia donatore che ricevente sembrano mostrare un picco di bioaccumulo a 72 ore dall'inoculo (con valori di circa 2 log superiori alle rispettive concentrazioni in acqua), per poi calare a valori molto simili a quelli osservati in acqua (**Figura 22**). E soprattutto, come ci si aspettava, la concentrazione del ceppo ricevente era 10 volte superiore a quella del donatore e si manteneva tra  $10^5$  cfu/g e  $10^6$  cfu/g per tutto l'esperimento. Anche la concentrazione del donatore rimaneva abbastanza alta almeno fino a 72 ore tra  $10^4$  cfu/ml e  $10^5$  cfu/g. Tuttavia, nonostante l'alta concentrazione di entrambi i ceppi all'interno del mollusco, anche in questo caso non sono stati ottenuti transconiuganti.



**Figura 22;** coniugazione *E. faecium* 1:10

Pur non avendo ottenuto transconiuganti da nessuno dei tre esperimenti, i migliori dati di bioaccumulo sono stati ottenuti nell'ultimo esperimento, per cui, per le successive prove di coniugazione, è stato deciso di inoculare donatore e ricevente contemporaneamente ed in rapporto 1:10.

#### 4.4.4. Saggi di coniugazione *in vivo*: ceppi diversi

Una volta stabilite le migliori condizioni per ottenere i massimi valori di bioaccumulo (durata 72h, coniugazione con rapporto donatore/ricevente 1:10 inoculati contemporaneamente), sono stati condotti saggi di coniugazione *in vivo* utilizzando diverse coppie di ceppi donatore/ricevente per valutare il trasferimento della resistenza al florfenicolo e alla tetraciclina.

##### Coniugazione 1:

- Donatore: *E. faecium* LSEF2, florfenicolo resistente (*poxtA*<sup>+</sup>), acido fusidico e rifampicina sensibile.
- Ricevente: *E. faecium* 64/3, acido fusidico e rifampicina resistente, florfenicolo sensibile.

##### Coniugazione 2:

- Donatore: *E. faecium* LSEF2, florfenicolo resistente (*poxtA*<sup>+</sup>), acido fusidico e rifampicina sensibile.
- Ricevente: *E. faecalis* JH2-2, acido fusidico e rifampicina resistente, florfenicolo sensibile.

##### Coniugazione 3:

- Donatore: *E. coli* ISZ 220, lac<sup>+</sup>, tetraciclina resistente (*tetA*<sup>+</sup>), acido nalidixico e rifampicina sensibile.

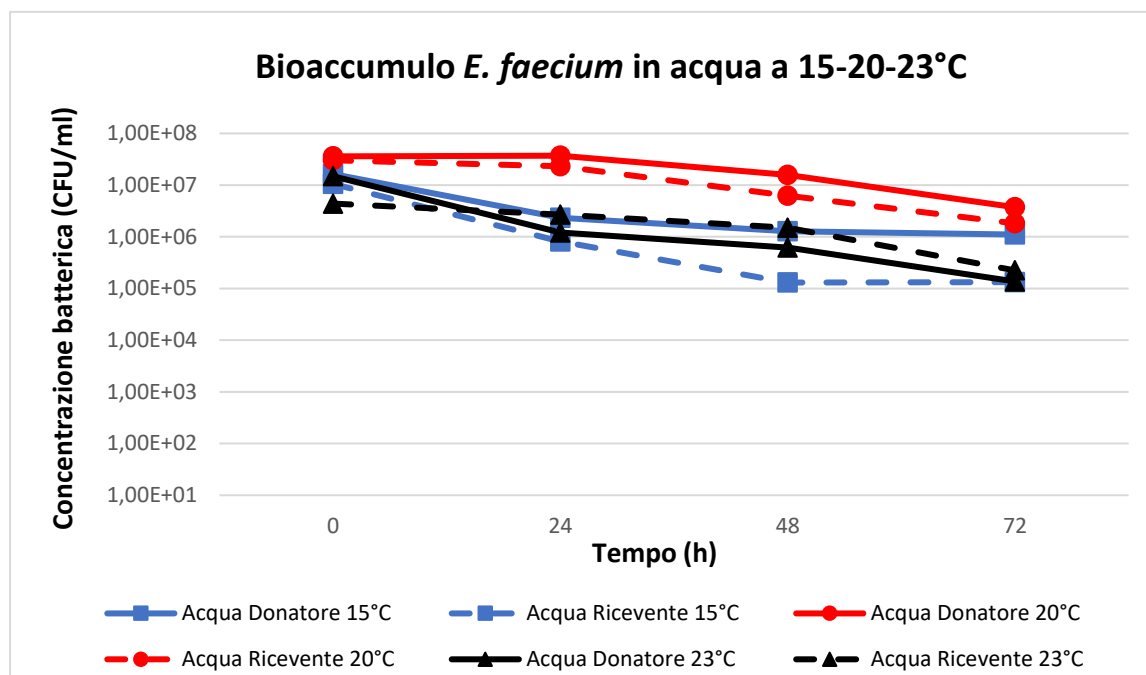
- Ricevente *E. coli* 1816, lac-, acido nalidixico e rifampicina resistente, tetraciclina sensibile.

L'unica coniugazione avvenuta con successo è stata la prima, in cui sono stati utilizzati i ceppi *E. faecium* LSEF2 ed *E. faecium* 64/3, che già *in vitro* avevano dimostrato la capacità di coniugare. Anche *in vivo* era confermato il trasferimento del gene *poxtA* e l'acquisizione della rispettiva resistenza al florfenicolo da parte del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3.

#### **4.4.5. Bioaccumulo e Saggi di coniugazione *in vivo* condotti a differenti temperature**

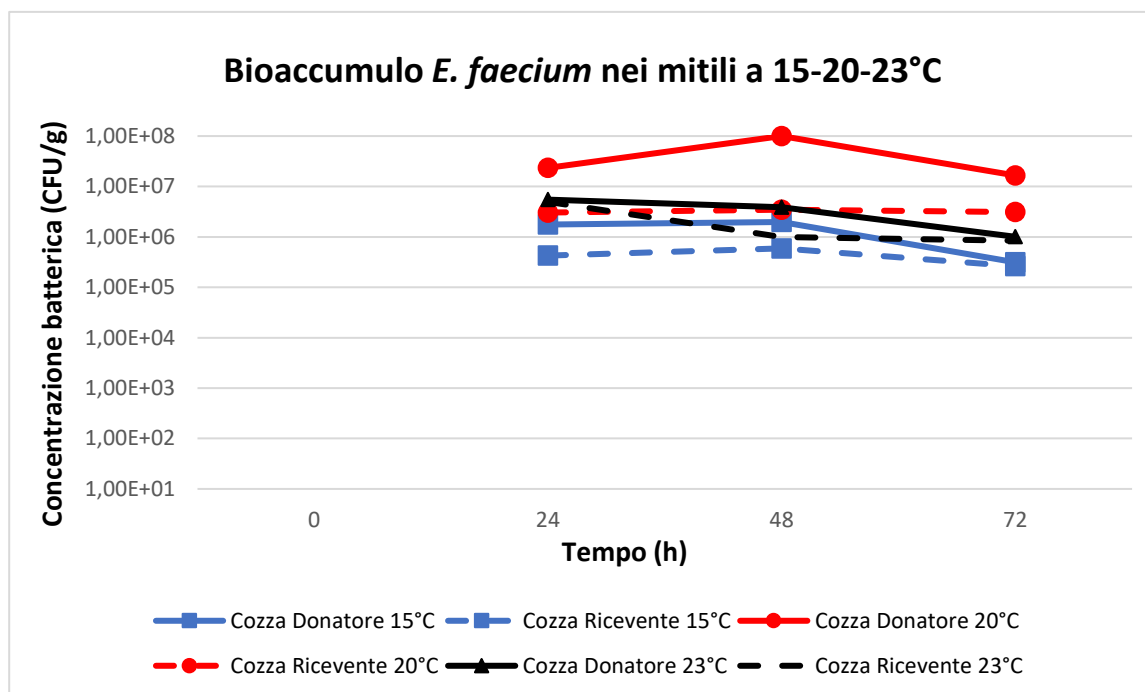
Una volta confermato il trasferimento *in vivo* del gene *poxtA* dal ceppo *E. faecium* LSEF2 a *E. faecium* 64/3, i due ceppi sono stati utilizzati ancora per saggi di coniugazione *in vivo*, variando la temperatura dell'acqua (15, 20 e 23°C), per verificare l'influenza della temperatura sulla capacità di bioaccumulo delle cozze e, di conseguenza, sulla capacità di trasferimento di materiale genetico tra i batteri.

Nell'acqua, donatore e ricevente seguono un andamento simile a tutte le temperature testate. Nella coniugazione condotta a 20°C nelle prime 24 h la concentrazione batterica rimane pressoché identica al tempo zero ( $\sim 3 \times 10^7$  cfu/ml), andando poi progressivamente a dimezzarsi ogni 24 h, raggiungendo l'ordine di grandezza di  $10^6$  cfu/ml. Nella coniugazione condotta a 15°C, invece, si ha una riduzione della carica batterica già dopo 24 h, passando da valori di  $1.6 \times 10^7$  cfu/ml al  $T_0$  a  $2.3 \times 10^6$  cfu/ml al  $T_{24}$  per poi stabilizzarsi e scendere molto più lentamente nei giorni successivi, rimanendo sempre nello stesso ordine di grandezza (**Figura 23**).



**Figura 23;** confronto bioaccumulo in acqua a 15-20-23°C

Nelle cozze, la concentrazione del ricevente rimane invariata sia a 20, che a 15°C di temperatura, con un logaritmo in più a 20°C ( $3 \times 10^6$  cfu/g) rispetto ai 15°C ( $4 \times 10^5$  cfu/g). Per quanto riguarda l'andamento del donatore, nell'esperimento a 15°C, rimane costante nelle prime 48h per poi diminuire di circa un logaritmo a 72h. A 20°C, invece, il donatore triplica la sua concentrazione nelle cozze dopo 48 h, per poi ridursi di circa 1/3 e ritornare ai valori iniziali alle 72h. Anche per quanto riguarda il donatore, nelle cozze, a 20°C si ha un bioaccumulo di circa un logaritmo superiore ( $10^7$  cfu/g vs  $10^6$  cfu/g) rispetto a quanto si osserva a 15°C (**Figura 24**).



**Figura 24;** confronto bioaccumulo nei mitili a 15-20-23°C

Rispetto all'esperimento condotto a 23°C, la concentrazione batterica in acqua a temperature inferiori (15-20°C) sembra calare più lentamente. Per quanto riguarda il bioaccumulo nelle cozze, anche a 23°C si ha circa un logaritmo in meno rispetto all'acqua per il donatore, stesso ordine di grandezza dell'acqua invece per il ricevente. Ad ogni temperatura testata, il bioaccumulo nelle cozze sembra essere piuttosto stabile nel tempo, calando lentamente nell'arco delle 72 ore.

#### 4.4.6. Efficienza di coniugazione

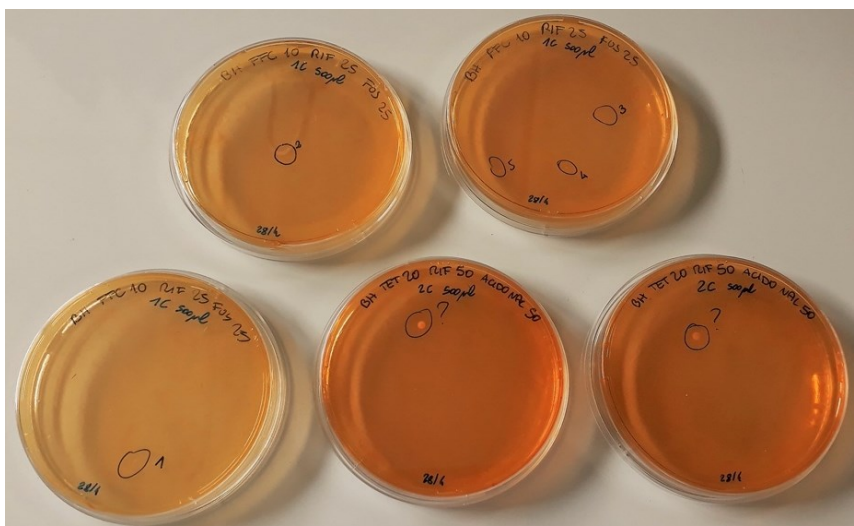
Per quanto riguarda l'efficienza della coniugazione, sono stati ottenuti dei transconiuganti sia negli esperimenti condotti a 20°C che a 23°C, suggerendo che, a temperature superiori, i mitili rappresentano un "ambiente" più favorevole allo scambio di materiale genetico tra batteri. Nessun

transconiugante è stato, invece, isolato dall'acqua, anche variando la temperatura.

Nell' esperimento condotto a 23°C sono state contate complessivamente 7 colonie di *Enterococcus spp.* su piastre BH selettive per i transconiuganti, derivanti dall'omogenato delle cozze (**Figura 25**). Di queste, 2 colonie non sono più ricresciute, evidentemente si era trattato di una contaminazione. Al contrario, 5 si sono confermati transconiuganti, in quanto sono stati ripassati tre volte, e tutte e tre le volte sono ricresciuti su piastre selettive (con florfenicolo, rifampicina e acido fusidico). La concentrazione dei transconiuganti nella cozza era di 1.67 cfu/g ed è stata calcolata seguendo il calcolo:

$$\frac{[2,5 \text{ (colonie per 1 ml di omogenato)} \times 3 \text{ (ml di omogenato risospeso)}]}{4,5 \text{ (g di cozza raccolti)}}$$

Di conseguenza, considerando la concentrazione del ricevente ( $4,95 \times 10^6$  ufc/g), la coniugazione *in vivo* è avvenuta con una frequenza di  $3.37 \times 10^{-7}$ .



**Figura 25;** colonie di transconiuganti cresciute su terreni selettivi

Nell'esperimento condotto a 20°C invece, si è osservata la presenza di 80 colonie di transconiuganti al tempo 24. Le colonie sono cresciute dopo incubazione a 37 °C per 48 ore e sono state ripassate per ben 3 volte su piastre SB con antibiotici per confermare la resistenza. La concentrazione di transconiuganti nella cozza era di 16,06 cfu/g ed è stata calcolata come di seguito:

$$\frac{[40 (\text{colonie per } 1 \text{ ml di omogenato}) \times 3 (\text{ml di omogenato risospeso})]}{7,47 (\text{g di cozza raccolti})}$$

Di conseguenza, considerando i valori di concentrazione del ricevente ( $3.04 \times 10^6$ ), la coniugazione è avvenuta con una frequenza di  $5.28 \times 10^{-6}$ . Si osservava, quindi, che la frequenza di coniugazione *in vivo* a 20°C era più alta rispetto a quella a 23°C:  $5.28 \times 10^{-6}$  vs  $3.37 \times 10^{-7}$ .

#### **4.5. Analisi genotipica e fenotipica dei ceppi transconiuganti**

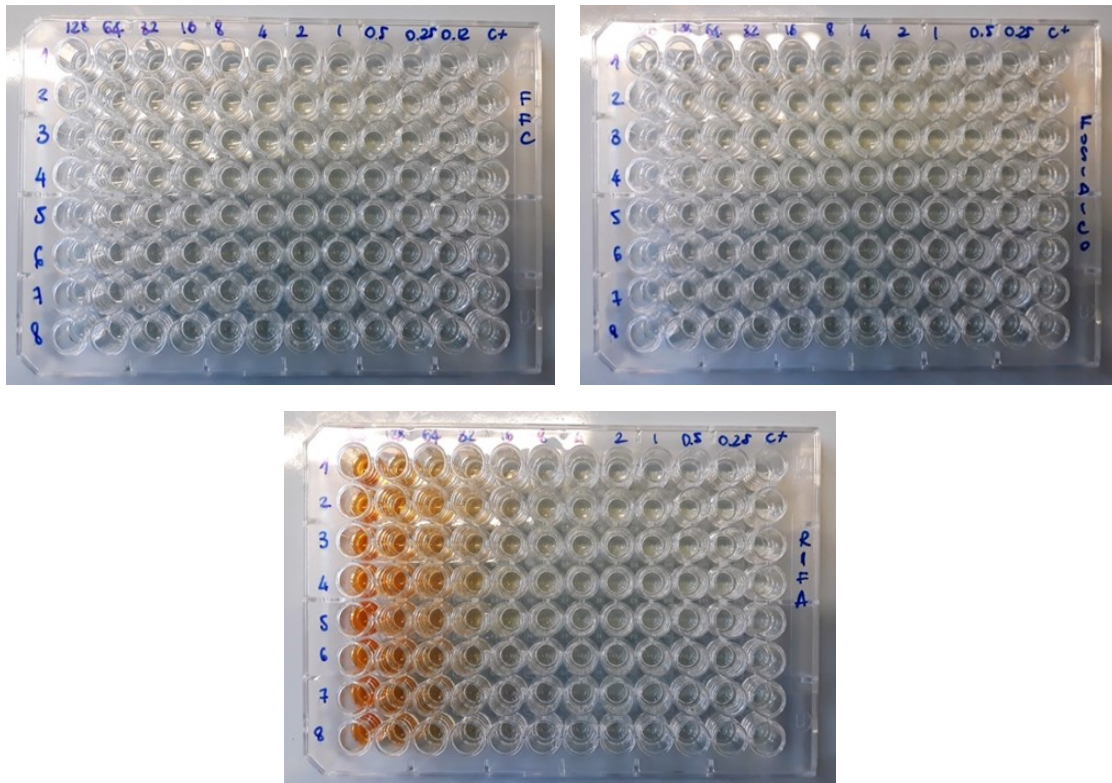
Sono stati selezionati 5 dei presunti transconiuganti ottenuti nei due esperimenti di coniugazione *in vivo* e sono stati sottoposti all'estrazione del DNA, analisi di PCR, PFGE e determinazione della sensibilità agli antibiotici (MIC) per confermarne l'identità. Dalle 5 colonie, denominate TC1, TC2, TC3, TC4 e TC5, è stato estratto il DNA mediante kit Roche High Pure Template Kit e la sua concentrazione è stata analizzata al nanodrop con i seguenti risultati **(Tabella 12)**:

*Tabella 12; concentrazioni di DNA dei transconiuganti*

	ng/μl	260/280	260/230
<b>TC1</b>	24.2	1.31	0.69
	24.7	1.24	0.69
<b>TC2</b>	21.5	1.19	0.88
	21.6	1.26	0.80
<b>TC3</b>	21.6	1.30	0.92
	21.5	1.27	0.94
<b>TC4</b>	19.1	1.27	0.94
	18.3	1.31	0.93
<b>TC5</b>	16.5	1.17	0.77
	15.8	1.21	0.76

I transconiuganti sono stati sottoposti alla determinazione della sensibilità agli antibiotici tramite microdiluizione in brodo (MIC). Si sono allestite tre micropiastre rispettivamente per florfenicolo, rifampicina ed acido fusidico, con concentrazioni scalari di antibiotico (**Figura 26**).





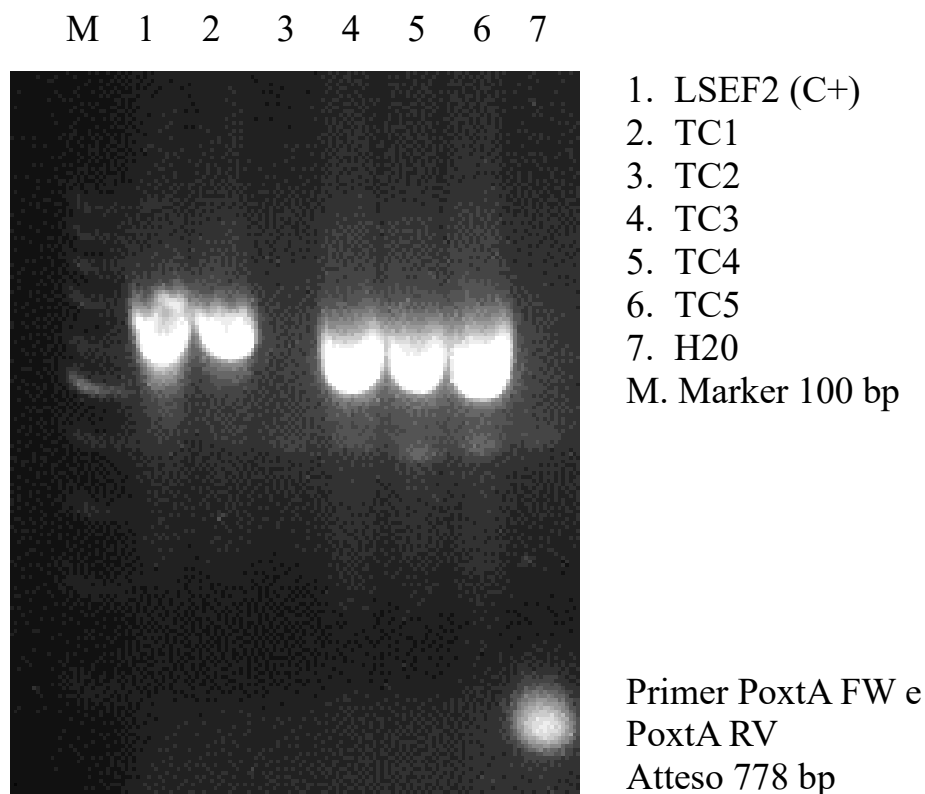
**Figura 26;** MIC dei transconiuganti per il florfenicolo, acido fusidico e rifampicina

I risultati della MIC confermano che i transconiuganti erano resistenti alla rifampicina e all'acido fusidico come il ceppo ricevente e mostravano resistenza anche al florfenicolo con valori di MIC compresi tra 64 e 128  $\mu\text{g/ml}$  come il donatore (**Tabella 13**).

**Tabella 13;** MIC dei ceppi transconiuganti, FFC = florfenicolo, RIFA = rifampicina, FUS = acido fusidico

	MIC (µg/ml)		
	FFC	RIFA	FUS
<b>TC1</b>	64	128	256
<b>TC2</b>	64	64	256
<b>TC3</b>	64	64	256
<b>TC4</b>	64/128	16	256
<b>TC5</b>	128	128	256
<b>LSEF2</b>	128	2	4
<b>64/3</b>	2	128	256

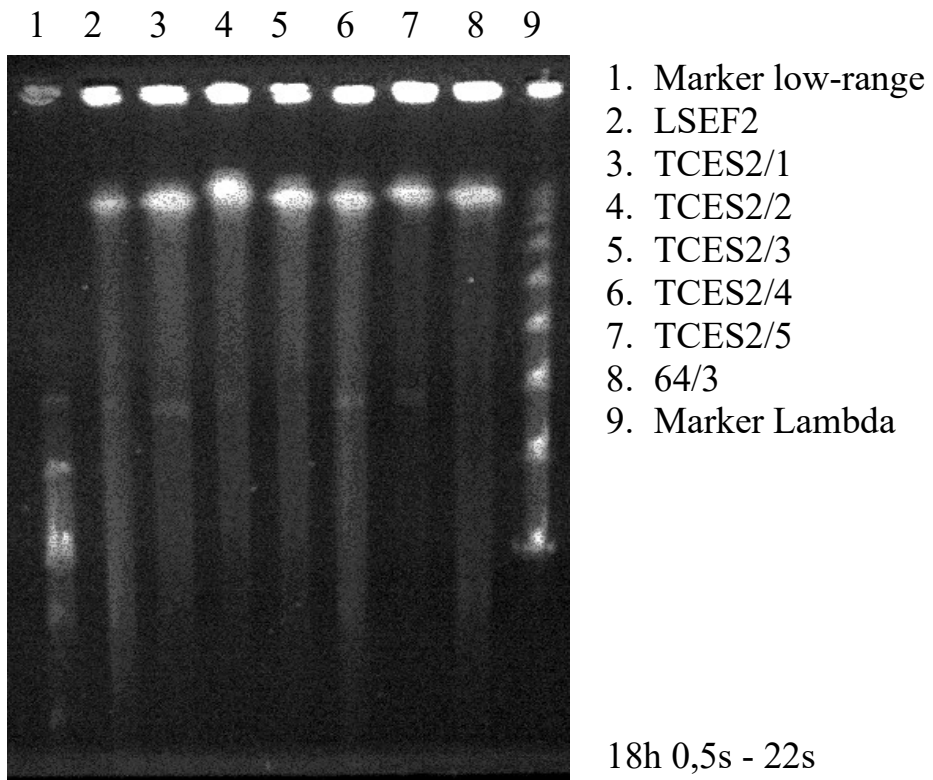
Successivamente, per confermare il passaggio della resistenza al florfenicolo, i cinque transconiuganti selezionati sono stati analizzati mediante saggi di PCR per valutare l'effettiva presenza del gene *poxA*. Tutti i ceppi, ad eccezione di TC2, erano positivi per il gene *poxA*, confermandosi ancora come possibili transconiuganti (**Figura 27**).



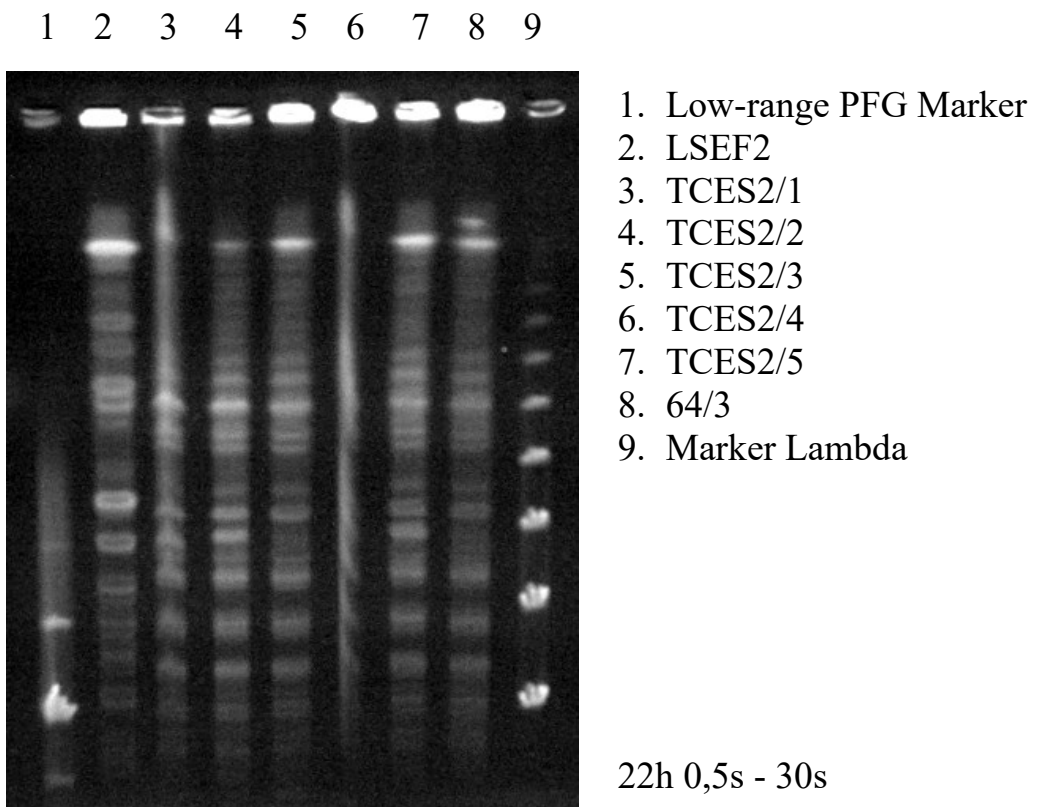
*Figura 27; PCR per il gene poxtA*

Infine, i 5 transconiuganti sono stati tipizzati mediante S1-PFGE e SmaI-PFGE. La S1-PFGE confermava il trasferimento ai transconiuganti di un plasmide di ~ 140 kb, presente anche nel donatore. Il sequenziamento dell'intero genoma del ceppo donatore, analizzato precedentemente a questo studio, aveva infatti dimostrato la presenza del gene *poxtA* a livello plasmidico (**Figura 28**).

La SmaI-PFGE, inoltre, confermava definitivamente che i ceppi selezionati erano transconiuganti, poiché mostravano un profilo di PFGE diverso dal donatore *E. faecium* LSEF2 e simile a quello del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3, tranne per la presenza di una banda di ~ 140 bp, che corrisponde alle dimensioni del plasmide più grande di LSEF2 (**Figura 29**).



*Figura 28; S1-PFGE*



*Figura 29; SmaI-PFGE*

## 5. DISCUSSIONE

L'antibiotico resistenza è un naturale processo evolutivo nei procarioti, ma questo fenomeno negli ultimi anni è aumentato progressivamente, tanto che oramai, batteri resistenti agli antibiotici vengono isolati dagli ambienti più disparati. Molto preoccupante è la diffusione della resistenza nell'ambito dei patogeni umani, per le importanti implicazioni in termini di salute pubblica globale. L'antibiotico-resistenza è infatti un problema, sia da un punto di vista clinico (per l'elevata morbilità e mortalità associata ad infezioni batteriche da batteri resistenti e multi-resistenti, contro i quali sono rimasti ben pochi antibiotici efficaci), sia in termini di ricadute economiche (maggiori costi per il servizio sanitario per le lunghe degenze e trattamenti terapeutici più onerosi). L'OMS nel 2015 e successivamente anche l'Unione Europea nel 2017 hanno adottato dei piani d'azione per contrastare l'antibiotico-resistenza, secondo un approccio "One Health" che considera in modo integrato la salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente. Tuttavia, con l'emergenza covid-19, il problema dell'antibiotico-resistenza è passato in secondo piano, ma è peggiorato proprio durante la pandemia ([www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html](http://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html)). Questo a causa della lunga degenza dei pazienti (che li ha messi a rischio di contrarre infezioni nosocomiali), della prescrizione di antibiotici per contrastare co-infezioni nei pazienti con covid-19, e all'ampio utilizzo di biocidi in tutti gli ambienti, che spesso esercitano una pressione selettiva sui ceppi antibiotico-resistenti al pari degli antibiotici (Knight 2021). È necessario, quindi, intervenire ancora più rapidamente e, soprattutto, è richiesta la partecipazione a tutti i livelli; politico, medico, veterinario, agricolo, ambientale, industriale e pubblico in generale. Ad ogni modo, resta da vedere se le attività possono essere sufficientemente coordinate in tutto il mondo per effettuare un

cambiamento radicale della situazione (N. Sabtu, D. A. Enoch, and N. M. Brown, 2015). Sono di rilevanza clinica sia i determinanti di resistenza osservati nei patogeni che quelli nei batteri commensali ed ambientali, i quali costituiscono un serbatoio da cui i batteri stessi possono acquisire resistenze tramite meccanismi di trasferimento genico orizzontale (HGT) (Frieri, Kumar, e Boutin 2017). Sebbene l'emergere di nuovi fattori di resistenza e la mobilitazione di quelli già esistenti avvengano continuamente, solo pochi di questi vengono selezionati e si stabilizzano in maniera permanente tra le popolazioni batteriche. Di conseguenza, è probabile che quelli che riescono a raggiungere le specie patogene sono quelli che hanno un costo di *fitness* molto basso, e che pertanto saranno difficili da eliminare. Il reclutamento di nuovi geni di resistenza nei patogeni, d'altro canto, ha il potenziale di causare conseguenze devastanti per la salute umana, come resistenze contro nuovi antibiotici o meccanismi più efficienti contro quelli già esistenti (J. Bengtsson, P. E. Kristiansson e D. G. J. Larsson, 2018).

Questo lavoro di tesi ha avuto, principalmente, l'obiettivo di studiare il fenomeno degli scambi genetici tra batteri e di valutare la possibilità che i molluschi possano rappresentare, nell'ambiente naturale, un potenziale serbatoio di antibiotico-resistenza, nonché un ambiente favorevole al trasferimento di geni di resistenza. È stato quindi messo a punto, per la prima volta, un modello di coniugazione *in vivo*, utilizzando i mitili per testare la trasferibilità di determinanti di resistenza tra ceppi di *Enterococcus spp.* ed *Escherichia coli*, che sono batteri indicatori di contaminazione fecale delle acque e allo stesso tempo potenziali patogeni opportunisti per l'uomo.

Sono stati innanzitutto selezionati alcuni ceppi appartenenti al genere *Enterococcus spp.*, precedentemente isolati da campioni di sedimento, acqua e

zooplancton, ottenuti da diverse campagne di campionamento effettuate nell'area costiera di Ancona. L'analisi di sensibilità agli antibiotici aveva evidenziato una maggiore frequenza di resistenza alla gentamicina (45% dei ceppi), seguita dalla resistenza all'ampicillina (32%), al florfenicolo (28%), alla daptomicina e alla vancomicina (circa il 3%). Questi risultati sono in linea con la letteratura, in particolare la resistenza alla gentamicina e all'ampicillina sono molto diffuse anche nei ceppi isolati dall'ambiente, in quanto possono essere il risultato del trasferimento genico orizzontale nonché di meccanismi di resistenza intrinseci (Gagetti, 2019), (Hoffmann, 1987), (Eliopoulos G. M., 1993). Mentre la resistenza al florfenicolo ed agli ossazolidinoni potrebbe essere più preoccupante, in quanto questi rappresentano i farmaci di ultima istanza nel trattamento di infezioni gravi da batteri Gram-positivi resistenti ad altri antibiotici (Sadowy E., 2018). Inoltre, il ritrovamento di questi ceppi in ambiente marino indica, non solo la possibile contaminazione delle acque costiere da reflui ospedalieri, ma anche la capacità di questi ceppi di sopravvivere in habitat secondari e di diffondere ulteriormente la resistenza a importanti classi di antibiotici. Per tale motivo sono stati selezionati, per questo studio, proprio quei ceppi resistenti alla vancomicina (VRE) e al florfenicolo.

I ceppi resistenti al florfenicolo erano stati identificati come *E. faecium* (KSEF3, LSEF2 e NSEF3), *E. hirae* (PSEF5, QZEF2 e QZEF6) ed *E. faecalis* (JSEF3). Tutti gli isolati possedevano il gene *poxA*, tranne JSEF3, che portava il gene *optrA*. I ceppi VRE (KSEG1, KSEG2, KSEG3, KSEG7, KHEG2, BSEG7), erano multi-resistenti (resistenza anche a gentamicina e ampicillina), sebbene analizzati solo dal punto di vista fenotipico. Appartenevano tutti alla specie *E. faecium* e dall'analisi mediante PCR erano tutti positivi, ad eccezione del ceppo BSEG7, per il gene *vanA*, il quale conferisce un alto livello di

resistenza sia alla vancomicina che alla teicoplanina ed è notoriamente situato su un trasposone (Tn1546) non coniugativo, ma frequentemente localizzato su plasmidi coniugativi in enterococchi di origine clinica (Mohamed O Ahmed, Keith E Baptiste, 2017). In ambito ospedaliero particolare importanza hanno assunto specifici cloni epidemici di VRE come il complesso clonale CC17, o determinati plasmidi responsabili della disseminazione della vancomicino-resistenza anche tra ceppi appartenenti a linee genetiche diverse (Pinholt M, Gumpert H, Bayliss S et al, 2017).

Per approfondire lo studio del trasferimento genetico orizzontale delle antibiotico-resistenze, sono stati allestiti diversi esperimenti di coniugazione batterica sia *in vitro* che *in vivo*. In pratica, è stato messo a punto un modello *in vivo*, utilizzando dei mitili e variando, di volta in volta, alcuni parametri, quali: la temperatura del sistema (15-20-23°C), la concentrazione batterica del donatore o del ricevente, il rapporto tra i due ceppi e il tipo di ceppi. In particolare, per questi saggi sono state utilizzate delle coppie di batteri che, *in vitro*, avevano dimostrato la capacità di trasferire un plasmide di resistenza a ceppi appartenenti alla stessa specie. Uno dei donatori era rappresentato da un ceppo di *E. faecium* (LSFE2) isolato da sedimento marino e resistente agli oxazolidinoni per la presenza del gene *poxtA* su un plasmide di circa 140 kb; tale ceppo è in grado di trasferire la resistenza con una frequenza di  $6,5 \times 10^{-1}$ . L'altro donatore era un ceppo di *Escherichia coli* (ISZ220) isolato da vongole, in grado di trasferire la resistenza alla tetraciclina, mediata dal gene *tetA* presente su un plasmide di circa 110 kb, con una frequenza di  $4,8 \times 10^{-3}$ . Prima degli esperimenti di coniugazione *in vivo*, è stato necessario assicurarsi l'assenza di queste specie batteriche all'interno dei molluschi e a tale scopo le cozze sono state prima depurate per due settimane in acqua di mare sterile e poi



omogenate e piastrate per verificare la crescita di enterococchi e coliformi. Quindi, verificata la “purezza” dei molluschi, è stata valutata la capacità di bioaccumulo delle cozze, cioè la capacità dei molluschi di filtrare e mantenere nei propri tessuti elevate concentrazioni di batteri vitali, in grado quindi di compiere scambi genetici. Sono state eseguite diverse prove per riuscire a capire quali fossero le condizioni migliori, sia di temperatura dell’acqua che di inoculo batterico, per avere la maggiore attività di filtrazione da parte delle cozze e, di conseguenza, la più alta concentrazione batterica internamente ai molluschi. La coniugazione *in vivo* nei mitili, ha avuto successo sia a 23°C che a 20°C di temperatura dell’acqua, ma solo con il donatore *E. faecium* LSFE2 e con il ricevente *E. faecium* 64/3. Nell’esperimento di coniugazione condotto a 23°C la frequenza di coniugazione era di  $3.37 \times 10^{-7}$  rispetto al ricevente, mentre nell’esperimento a 20°C la frequenza è stata di  $5.28 \times 10^{-6}$ .

I transconiuganti sono stati tutti ripassati più volte in piastre SB selettive, contenenti rifampicina, florfenicolo e acido fusidico per testare la stabilità della loro resistenza e sono stati sottoposti alla determinazione della MIC agli antibiotici di selezione, a saggi di PCR e PFGE per confermarne l’identità. Questi saggi, fenotipici e genotipici, hanno ribadito il fatto che non si trattava né del donatore né del ricevente, ma di ceppi derivati dal ricevente (resistenti alla rifampicina e all’acido fusidico), che avevano acquisito la resistenza al florfenicolo dal ceppo donatore, tramite coniugazione. La PCR per ricercare il gene *poxtA* nei transconiuganti dimostrava che tutti erano *poxtA* + tranne il ceppo TC2. I transconiuganti (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5) dell’esperimento condotto a 23°C sono stati anche saggiati con S1-PFGE e SmaI-PFGE. La SmaI-PFGE confermava la loro identità, poiché mostravano un profilo di PFGE diverso dal donatore LSEF2 e simile a quello del ricevente 64/3. La S1-PFGE

invece, confermava il passaggio ai transconiuganti di un plasmide di ~ 140 bp.

In questo lavoro di tesi si è evidenziata l'importanza dell'ambiente marino come passaggio fondamentale nel ciclo delle antibiotico-resistenze, suggerendo anche la possibilità che in condizioni naturali, gli organismi marini ed in particolare i molluschi possano rappresentare habitat favorevoli per scambi genetici tra batteri resistenti. Ad oggi, infatti, la resistenza agli antibiotici non viene più considerata una problematica solamente collegata agli ambienti nosocomiali, ma relativa anche agli ambienti naturali, dove le resistenze possono generarsi, accumularsi e diffondersi. Tuttavia, in questo ambiente, il monitoraggio del fenomeno è ancora poco approfondito. I dati ottenuti in questo studio dimostrano che fenomeni di coniugazione batterica, pur se con una frequenza di ricombinazione non altissima, possono verificarsi nell'ambiente marino, e sicuramente gli organismi filtratori, come i mitili, facilitano l'accumulo di batteri e lo scambio di materiale genetico tra essi. Inoltre, questi risultati evidenziano il ruolo che i mitili potrebbero avere, non solo nella diffusione delle antibiotico-resistenze in ambiente marino, ma anche nella trasmissione all'uomo attraverso la via alimentare di batteri resistenti e geni di resistenza. Questo lavoro, dunque, pone le basi per studi futuri che potranno coinvolgere diverse specie batteriche, diverse classi di antibiotici e diverse aree geografiche, al fine di ottenere un quadro della situazione più completo e accurato possibile. Una migliore conoscenza di tale fenomeno consentirà una comprensione più dettagliata dei meccanismi che regolano le antibiotico-resistenze, allo scopo di contenere la loro disseminazione con maggiore efficienza ai fini della tutela della salute pubblica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ahmed M., Baptiste K. (2017), *Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health*, doi: 10.1089/mdr.2017.0147.

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.

Aminov R.I.(2009), *The role of antibiotic and antibiotic resistance in nature. Environmental microbiology*, 11(12), 2970–2988.

Aznar, R., Carranza, E., Lacasa, J., Serrano, R., & Ziad, F, (1991), Bacteriemia en un hospital comarcal. Revisión de 78 casos [Bacteremia in a community hospital. Review of 78 cases]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 9(6), 339–344.

Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogen and potential probiotics. *BioMed research international*, 2019.

Bengtsson J., Kristiansson P. E. e Larsson D. G. J. (2018), *Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic*, Centre for Antibiotic Resistance Research (CARe), University of Gothenburg. *FEMS Microbiology Reviews*, fux053, 42, 2018, 68–80

BRIANCESCO (2005), *Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque*, dipartimento di Ambiente, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Cabezòn E., Rozada J. R., Pena A., Cruz F. e Arechaga I. (2015), *Towards an integrated model of bacterial conjugation*, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Spain. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 2015, 81–95 doi: 10.1111/1574-6976.12085.

Chatti M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. (2013). *The expanding bacterial type IV secretion lexicon*. *Res Microbiol* 164:620–639.

CLSI M07-A10- Clinical and Laboratory Standard Institute, (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard—Tenth Edition).

Courvalin, P. (2008), *Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance*. *Journal of internal medicine*, 264(1), 4-16.

D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C. e Wright, G. D. (2011). *Antibiotic resistance is ancient*. *Nature*, 477(7365), 457-461.

Davies, J., & Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.

Devane, M., Moriarty, E., Weaver, L., Cookson, A., & Gilpin, B. (2020). *Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring. Water Research*, 116204.

Dunny GM. (2007), *The peptide pheromone-inducible conjugation system of Enterococcus faecalis plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*362:1185–1193.

Eliopoulos G. M. (1993). *Aminoglycoside resistant enterococcal endocarditis. Infectious disease clinics of North America*, 7(1), 117–133.

Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., & Brenner, H. (2007). *Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations. European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 26(2), 83–90.

Ewing, W. H. (1986). Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.*, (Edition 4) 135-172.

Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). *Pathogenicity of enterococci. Gram- Positive Pathogens*, 378-397.

Fioriti S., Coccitto S., Cedraro N, Simoni S., Morroni G., Brenciani A., Mangiaterra G., Vignaroli C., Vezzulli L., Biavasco F., Giovanetti E. (2021), *Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and*

*Zooplankton in Two Italian Coastal Areas*, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic University of Marche, <http://aem.asm.org/>.

Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.

Gagetti, P., Bonofiglio, L., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Vigliarolo, L., von Specht, M., Toresani, I., & Lopardo, H. A. (2019). Resistance to  $\beta$ -lactams in enterococci. *Revista Argentina de microbiologia*, 51(2), 179–183.

Gaschignard, J., Levy, C., Romain, O., Cohen, R., Bingen, E., Aujard, Y., & Boileau, P. (2011). Neonatal bacterial meningitis: 444 cases in 7 years. *The Pediatric infectious disease journal*, 30(3), 212-217.

Goessweiner-Mohr N., Arends K., Keller W. and Grohmann E. (2014), *Conjugation in Gram-Positive Bacteria*, Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Austria; Robert Koch-Institute, Berlin, Germany; Albert-Ludwigs-University Freiburg, Germany; Division of Infectious Diseases, University Medical Centre Freiburg, Germany.

Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., ... & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3-30.

Heroven, A. K., Nuss, A. M., & Dersch, P. (2017). *RNA-based mechanisms of virulence control in Enterobacteriaceae*. *RNA biology*, 14(5), 471-487.

Hoffmann, S. A., & Moellering, R. C., Jr (1987). *The enterococcus: "putting the bug in our ears"*. *Annals of internal medicine*, 106(5), 757–761.

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). *Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review*. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570-581.

Joakim Larsson D. G. e Flach C. F. (2021), *Antibiotic resistance in the environment*, Centre for Antibiotic Resistance Research at University of Gothenburg, Sweden, <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.

José L. Martínez (2008), *Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments*, *Science*, 321(5887), 365-367.

Knight GM, Glover RE, McQuaid CF, Oлару ID, Gallandat K, Leclerc QJ, Fuller NM, Willcocks SJ, Hasan R, van Kleef E, Chandler CI. Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. *Elife*. 2021 Feb 16;10: e64139. doi: 10.7554/eLife.64139.

Liu, B., & Pop, M. (2009). *ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database*. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D443–D447.

Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). *Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221–1236.

Murray, B. E. (2000). *Vancomycin-resistant enterococcal infections. New England Journal of Medicine*, 342(10), 710-721.

Partridge S. R., Kwong S. M., Firth N., Jensen S. O. (2018), Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance, Centre for Infectious Diseases and Microbiology, The Westmead Institute for Medical Research, The University of Sydney, and Westmead Hospital.

Pinholt M, Gumpert H, Bayliss S et al (2017), *Genomic analysis of 495 vancomycin-resistant Enterococcus faecium reveals broad dissemination of a vanA plasmid in more than 19 clones from Copenhagen, Denmark. J, Antimicrob Chemother* 2017; 72: 40–7.

Ramirez MS and ME Tolmasky, 2010, *Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat*, vol. 13, no. 6: 151-171).

Raza, T., Ullah, S. R., Mehmood, K., & Andleeb, S. (2018). *Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. J Pak Med Assoc*, 68(5), 768-772.

Sabtu N., Enoch D. A. e Brown N. M. (2015), *Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. Clinical Microbiology & Public Health Laboratory, Cambridge University. 116:105–113 doi: 10.1093/bmb/ldv041.*



Sadowy E., (2018). *Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. Plasmid, 99, 89–98.*

Vignaroli C, G Zandri, L Aquilanti, S Pasquaroli, Francesca Biavasco, 2011. *Multidrug-Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an Enterococcus durans to a Human Enterococcus faecium. Curr Microbiol, vol. 62, no.5: 1438–1447).*

## 7. FONTI DELLE IMMAGINI

**Figura 1;** le fasi principali del ruolo dell'ambiente nel reclutamento di geni di resistenza agli antibiotici (ARG) per i patogeni umani J. Bengtsson, P. E. Kristiansson and D. G. J. Larsson (2018)

**Figura 2;** effetto degli antibiotici sull'espressione genica batterica, José L. Martínez (2008), *Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments*, *Science*, 321(5887), 365-367.

**Figura 3;** vie di trasmissione di patogeni batterici e reclutamento di geni di resistenza dal microbiota ambientale, D. G. Joakim Larsson and Carl-Fredrik Flach, 2021.

**Figura 4;** *Enterococcus* spp.,  
<https://www.sciencephoto.com/media/798892/view/enterococcus-faecalis-coccus-prokaryote-sem>

**Figura 5;** *Escherichia coli*,  
<https://www.google.it/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.focus.it>.

**Figure 6 e 7;** struttura genetica delle regioni Mpf e Dtr del plasmide coniugativo R388., e sistema di secrezione di tipo IV (T4SS), E. Cabezón, 2015.

**Figura 8;** modello del pathway di trasferimento di pIP501; N. Goessweiner-Mohr, K. Arends, W. Keller and E. Grohmann, 2014.

**Figura 9;** foto di un mitile (*Mytilus edulis*) aperto, Wang e Fisher, 1999; Haukas et al., 2010; Farrell e Nelson, 2013; Larsen et al., 2016.

**Figure 10 – 29;** immagini acquisite durante il lavoro di tesi

*Vorrei concludere innanzitutto ringraziando la forza di volontà e determinazione, che mi hanno consentito di raggiungere questo traguardo nel migliore dei modi, facendomi appassionare a tutto questo percorso universitario.*

*Ringrazio, in particolar modo, la mia famiglia, che mi ha dato la possibilità, per nulla scontata, di intraprendere e portare a termine questo viaggio, sostenendomi nei momenti di difficoltà e condividendo con me le gioie dei momenti felici.*

*Un ringraziamento speciale, non di meno valore, va al mio fidanzato Andrea, che c'è sempre stato, supportandomi ed aiutandomi lungo questo cammino. Non sarebbe stato lo stesso senza di lui al mio fianco.*

*Ringrazio immensamente la Prof.ssa Vignaroli per aver accettato di essere la relatrice della mia tesi. Serena, la mia correlatrice, Nicholas e Gianmarco per avermi insegnato tanto ed aiutato in tutti questi mesi all'interno dei laboratori di microbiologia del "Dipartimento Scienze della vita e dell'ambiente".*

*Ringrazio, inoltre, le mie nonne e gli zii, che hanno mostrato interesse nel mio percorso universitario, ed i miei nonni, che mi stanno sicuramente guardando da lassù.*

*In ultimo, vorrei ringraziare anche le compagne di corso, che mi hanno accompagnato, lezione dopo lezione, al termine di questo cammino durato due (cinque) anni, e le mie amiche "di una vita" al di fuori dell'università, che per me ci sono sempre state.*