



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia Molecolare e Applicata**

**RIPRISTINO DEL FENOTIPO RESISTENTE IN CEPPI DI  
ENTEROCOCCHI VANCOMICINA-VARIABILI ISOLATI  
DA CAMPIONI AMBIENTALI**

**SWITCH TO A RESISTANT PHENOTYPE OF  
VANCOMYCIN VARIABLE ENTEROCOCCI ISOLATED  
FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES**

Tesi di Laurea Magistrale

di: **Paolini Ilaria**

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa  
**Vignaroli Carla**

Correlatore

Dott.ssa **Simoni Serena**

**Sessione Autunnale**

**Anno Accademico 2023/24**

# INDICE

## Introduzione

1. Il genere <i>Enterococcus</i>	1
1.1 Patogenicità degli enterococchi	4
1.2 Enterococchi nell'ambiente	11
2. Antibiotico-resistenza	16
2.1 Antibiotico-resistenza degli enterococchi	21
2.2 Diffusione ambientale della resistenza	34
2.3 Enterococchi vancomicina-variabili (VVE)	40
Scopo della tesi	47
Materiali e metodi	48
1. Ceppi batterici utilizzati	48
2. Terreni di coltura e antibiotici	54
3. Estrazione del DNA batterico	57
4. Saggi di PCR	58

5.	Determinazione della MIC in brodo	60
6.	Determinazione della MIC in agar	62
7.	PFGE	63
8.	Saggi di produzione di biofilm	67
9.	Saggi di coniugazione <i>in vitro</i>	68
10.	Sviluppo <i>in vitro</i> della resistenza alla vancomicina	70
11.	Valutazione della stabilità del fenotipo di resistenza alla vancomicina	72
12.	Induzione della resistenza alla vancomicina	72
13.	Valutazione del numero di copie del gene <i>vanA</i> mediante qPCR	73
14.	Sequenziamento WGS (Whole Genome Sequencing) e analisi bioinformatica	74
	<b>Risultati</b>	<b>76</b>
1.	Selezione e caratterizzazione dei ceppi vancomicina-sensibili	76

2.	Identificazione dei ceppi	79
3.	Tipizzazione	81
4.	Produzione di biofilm	83
5.	Sviluppo <i>in vitro</i> del fenotipo resistente alla vancomicina	84
6.	Stabilità del fenotipo resistente alla vancomicina	86
7.	Induzione della resistenza alla vancomicina	89
8.	Determinazione del numero di copie del gene <i>vanA</i>	90
9.	Saggi di coniugazione	91
10.	Sequenziamento	93
	Discussione e conclusioni	97
	Bibliografia	106

# INTRODUZIONE

## 1. Il genere *Enterococcus*

Gli enterococchi sono microrganismi Gram-positivi, inizialmente compresi nel genere *Streptococcus* in cui erano classificati, secondo lo schema di tipizzazione di Lancefield, come streptococchi di gruppo D. Tuttavia, studi molecolari e di ibridazione degli acidi nucleici evidenziarono divergenze genetiche con gli streptococchi, portando nel 1984 al riconoscimento degli enterococchi come un genere distinto, noto come *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984; Fiore et al., 2019).

Oltre ad essere ubiquitari nell'ambiente, sono dei normali commensali ampiamente distribuiti soprattutto a livello intestinale sia dell'uomo che di molti animali dove si rendono utili nella digestione e altri processi metabolici; infatti, alcune specie sono utilizzate come probiotici per trattare disturbi intestinali.

La loro importanza è dovuta al fatto che, a partire dagli anni '80, sono ormai considerati dei rilevanti patogeni nosocomiali, comportandosi da opportunisti per l'uomo presentando sia resistenze intrinseche agli antibiotici sia una spiccata propensione ad acquisire nuovi determinanti di resistenza (Byappanahalli et al., 2012).

Gli enterococchi (**figura 1**) hanno una forma sferica o ovoidale e tendono a disporsi singolarmente o a formare coppie o brevi catenelle e appaiono con estremità leggermente acuminate. Sono non sporigeni, aerobi-anaerobi facoltativi e immobili, ad eccezione di *E. gallinarum* ed *E. casseliflavus*, che sono mobili. Hanno un optimum di temperatura di crescita a 35°C ma possono crescere in un range compreso fra i 10 e i 45°C. Possono crescere in presenza di NaCl al 6.5%. Sono catalasi negativi, di solito omofermentanti e non producono gas dalla fermentazione del glucosio.

La pigmentazione è una caratteristica variabile: le specie pigmentate sono comunemente isolate dalle piante e spesso la colorazione è gialla. Gran parte degli enterococchi è in grado di produrre leucina aminopeptidasi e riesce ad idrolizzare la pirrolidonil  $\beta$ -naftilamide, ciò può essere utilizzato per la loro identificazione.

Caratteristiche importanti che sono utili per differenziare gli Enterococchi dagli Streptococchi sono: la resistenza ai sali biliari (fino al 40%) e all'azide di sodio (fino a 0,4%), la capacità di crescere in presenza di esculina e di idrolizzarla (Lebreton *et al.*, 2014).



*Figura 1: Enterococcus spp.*

Se vengono coltivati su agar sangue, gli enterococchi formano colonie di 1-2mm con un aspetto umido e possono essere alfa-, beta- o non emolitici. Sulla base delle loro capacità metaboliche, sono stati creati diversi terreni di coltura selettivi per isolare gli enterococchi. Questi terreni spesso includono sali biliari, antibiotici, azide di sodio, esculina o sali di tetrazolio; non tutte le specie di enterococchi sono in grado di crescere in loro presenza, eccetto quelle di maggiore rilevanza clinica. I principali test clinici per identificare gli enterococchi comprendono il test della catalasi, il test dell'idrolisi della bile esculina e il test della pirrolidonilaminopeptidasi (PYR). Per rendere più semplice la rilevazione degli enterococchi in ambito clinico, sono stati sviluppati anche dei kit commerciali (García-Solache & Rice, 2019).

Il genere *Enterococcus* comprende attualmente oltre 50 specie diverse. Tra queste, *E. faecalis* e *E. faecium* sono quelle più frequentemente isolate, costituendo più dell'80% degli isolati e sono tra i patogeni nosocomiali più diffusi a livello mondiale, classificati rispettivamente al terzo e quarto posto come causa d'infezione ospedaliera. Al contrario, altre specie di *Enterococcus* come *E. hirae*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. raffinosus* sono raramente associate a infezioni cliniche umane rispetto a *E. faecium* ed *E. faecalis*. Fra le specie enterococciche più comuni che vanno a costituire il microbiota intestinale umano ci sono: *E. faecalis* ed *E. faecium*, mentre specie come *E. durans* ed *E. avium* vengono occasionalmente rilevate. Negli animali, invece, le specie di *Enterococcus* più frequentemente presenti nel microbiota intestinale includono *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* ed *E. durans* e altre specie che compaiono in modo sporadico (Torres *et al*, 2018).

## **1.1 Patogenicità degli enterococchi**

Gli enterococchi, pur essendo dei commensali abituali della flora batterica, in alcune situazioni possono diventare patogeni potenzialmente letali per l'uomo e i meccanismi secondo cui questo avviene non sono del tutto chiariti. In condizioni normali, gli enterococchi che risiedono



nell'intestino vengono tenuti sotto controllo dal sistema immunitario dell'ospite; una possibilità, quindi, è che nel momento in cui le difese dell'ospite si indeboliscono gli enterococchi possano sfruttare queste condizioni e prendere il sopravvento. Questo squilibrio potrebbe causare la traslocazione degli enterococchi dal lume intestinale al sangue e la conseguente diffusione sistemica. Un'altra ipotesi è che i microrganismi possano acquisire nuove caratteristiche di patogenicità tali da permettere loro di occupare nuove nicchie e procurare malattia (Koch et al., 2004).

Le infezioni da enterococchi possono essere di origine esogena o endogena e si ritiene che quest'ultima tipologia sia la più frequente in cui si osserva la traslocazione dei batteri attraverso le cellule epiteliali intestinali. Questi batteri riescono a raggiungere i linfonodi mesenterici e diffondono ad altre cellule dell'organismo.

Fra le infezioni più importanti e diffuse associate agli enterococchi si ricordano le endocarditi, le infezioni del tratto urinario, le sepsi neonatali, le batteriemie, le infezioni delle ferite chirurgiche e le meningiti (Fisher & Phillips, 2009). Essendo dei patogeni opportunisti, affinché si possa manifestare un'infezione devono esserci delle condizioni predisponenti. I fattori che possono alterare l'equilibrio ospite-commensale includono: interventi chirurgici addominali, l'uso di cateteri venosi e/o urinari e una

terapia antibiotica prolungata. (Butler, 2006). Vi è una prevalenza variabile delle infezioni da enterococchi che può manifestarsi a seconda delle diverse categorie di pazienti: individui immunocompetenti, pazienti sottoposti a interventi chirurgici o trattamenti medici, e pazienti immunocompromessi (Koch et al., 2004).

Gli enterococchi non sono microrganismi altamente virulenti, ma *E. faecium* ed *E. faecalis* presentano delle caratteristiche che sono state associate al loro potenziale patogeno (oltre alla capacità di sopravvivere in un ambiente ostile ricco di antibiotici come quello ospedaliero). Queste caratteristiche includono: la capacità di resistere all'acidità e ai Sali biliari presenti nell'intestino; la capacità di aderire ai tessuti dell'ospite; di interagire con differenti proteine della matrice extracellulare; di aderire ai dispositivi medici e la capacità di formare biofilm che li rende più resistenti sia agli antibiotici che alla fagocitosi (Fisher & Phillips, 2009; Byappanahalli et al., 2012).

L'adesione ai tessuti dell'ospite è sicuramente un requisito fondamentale per l'inizio dell'infezione da parte di molti batteri. I ceppi di enterococchi possiedono diversi fattori che conferiscono forti capacità adesive attraverso cui aderiscono tenacemente a differenti tessuti dell'ospite,

compreso il colon (evitando in questo modo di essere rimossi dalla peristalsi intestinale). Fra le proteine coinvolte nell'adesione si ricordano:

La sostanza di aggregazione (AS): è una proteina di superficie di 137 kDa dotata di una struttura a forcina ed è codificata da plasmidi di risposta ai feromoni (Ferchichi et al., 2021); la AS media il legame specifico degli enterococchi all'epitelio renale, intestinale e ai macrofagi. È stato dimostrato che in presenza di questa proteina aumenta sia l'internalizzazione degli enterococchi che la loro sopravvivenza a livello intracellulare (Koch, 2004, García-Solache & Rice, 2019). L'AS, facilita, inoltre, l'adesione fra le cellule batteriche costituendo il primo passo per il trasferimento dei plasmidi attraverso la coniugazione. Infine, questa proteina, gioca un ruolo chiave nello sviluppo di biofilm durante l'endocardite (Selleck *et al.*, 2021).

La proteina di superficie enterococcica (o Esp): è una proteina avente peso molecolare di 200 kDa e codificata dal gene *esp* presente su un'isola di patogenicità. Contribuisce alla colonizzazione e alla persistenza nelle infezioni del tratto urinario e delle valvole cardiache. È altamente espressa in *E. faecium* e ha un ruolo rilevante nei processi di adesione e formazione di biofilm

(Ferchichi et al., 2021). Tuttavia Esp non è essenziale, né è sufficiente, per l'instaurarsi dell'infezione: infatti non è sempre presente nei ceppi clinici (García-Solache & Rice, 2019).

La proteina di superficie EfaA (antigene specifico dell'endocardite): è codificata dal gene *efaA<sub>fs</sub>* in *E. faecalis* e dal gene *efaA<sub>fm</sub>* in *E. faecium*. Mostra somiglianze con differenti adesine degli Streptococchi (Ferchichi et al., 2021). EfaA fa parte di un sistema di trasporto di tipo ABC, insieme alle proteine EfaB e EfaC, specifico per il trasporto di manganese, che viene sovraespresso in *E. faecalis* quando il batterio cresce nel siero (Fiore et al., 2019).

Le proteine che costituiscono i pili Ebp: codificate dal cluster genico *ebp* in *E. faecalis*, responsabili della iniziale adesione agli epitelii e della formazione di biofilm nelle endocarditi infettive e nelle infezioni del tratto urinario (Fiore et al., 2019; García-Solache & Rice, 2019).

In seguito alla colonizzazione, i ceppi patogeni di *Enterococcus spp* sono in grado di secernere delle sostanze che possono avere un effetto distruttivo sia per i tessuti dell'ospite che per altri batteri (Selleck et al., 2021). I determinanti di virulenza secreti dagli enterococchi includono:

Citolisina/emolisina (Cyl): ha una attività emolitica significativa agendo contro gli eritrociti umani, di coniglio ed equini, provocando danno alle cellule dell'ospite e promuovendo l'infezione. Inoltre ha azione battericida contro altri batteri Gram-positivi. Ha sicuramente un ruolo importante nelle infezioni umane, essendo prodotta dal 10% al 70% dei ceppi isolati. L'operone della citolisina è solitamente localizzato su plasmidi coniugativi o in una isola di patogenicità spesso associata ai geni che codificano la AS (García-Solache & Rice, 2019).

Gelatinasi (GelE): è una zinco-metallo peptidasi secreta da *E. faecalis*. È capace di idrolizzare la caseina, il collagene, l'emoglobina e altri peptidi. Inoltre, può distruggere i feromoni sessuali, quindi potrebbe avere un ruolo nella modulazione della risposta dell'ospite all'infezione (Koch et al., 2004). La gelatinasi ha un ruolo importante nello sviluppo di endocardite e inibisce nell'ospite la risposta immunitaria mediata dal complemento (García-Solache & Rice, 2019).

Ialuronidasi (hyl) è una proteina codificata da un gene cromosomico. È stata riscontrata maggiormente in ceppi di *E. faecium* e, avendo attività proteolitica, è coinvolta nella

degradazione dei mucopolisaccaridi (come l'acido ialuronico), che uniscono tessuti e cartilagine, facilitando così la diffusione dei batteri (Ferchichi et al., 2021).

È stato infine dimostrato che *E. faecium* ed *E. faecalis*, sono in grado di produrre anche dei metaboliti tossici dell'ossigeno che possono danneggiare cellule o organi. A conferma di ciò, si è notato che *E. faecium*, in particolare, produce perossido di idrogeno. Inoltre, mutazioni dei geni che codificano per gli enzimi NADH ossidasi e NADH perossidasi modificano i livelli di produzione di perossido d'idrogeno e quindi l'entità del danno cellulare. La maggior parte dei ceppi di *E. faecalis* (meno frequentemente *E. faecium*) produce inoltre l'anione superossido ( $O_2^-$ ). È stato dimostrato che la produzione extracellulare di superossido e perossido di idrogeno potenzia il danno arrecato dagli enterococchi alle cellule dell'epitelio intestinale (Huycke et al., 2002). Il rilascio di questi prodotti tossici è probabilmente una conseguenza di un processo di respirazione incompleto (Fiore et al., 2019).

Un altro fattore di virulenza degli enterococchi è la formazione di biofilm, che rende le infezioni difficili da trattare poiché protegge i batteri dall'azione degli antibiotici. Come evidenziato precedentemente, diverse proteine sono cruciali nello sviluppo del biofilm. Inoltre, l'espressione dei

pili sulla superficie cellulare, che facilita l'adesione, è considerata un fattore scatenante per questo processo. La formazione del biofilm è strettamente legata al quorum sensing, un sistema di regolazione dell'espressione genica in risposta a elevate densità di popolazione cellulare. In *E. faecalis*, il biofilm è regolato dal locus *fsr*, che comprende tre geni principali: *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, situati vicino a due altri geni *gelE* e *sprE*, che codificano rispettivamente due importanti fattori di virulenza: la gelatinasi e una serina proteasi (Hashem et al., 2017).

Gli enterococchi sono in grado di comunicare non solo attraverso il sistema di quorum sensing Fsr ma anche tramite feromoni peptidici. Questi ultimi, vengono secreti dalle cellule riceventi per indurre nelle cellule donatrici la formazione dell'apparato coniugativo che media il trasferimento dei corrispondenti plasmidi di risposta ai feromoni. Alcuni di questi plasmidi contengono proprio i geni che regolano o promuovono la formazione del biofilm (Hashem et al., 2017).

## **1.2 Enterococchi nell'ambiente**

Gli enterococchi sono importanti membri del microbiota intestinale dell'uomo e di altri animali a sangue caldo e talvolta possono comportarsi da patogeni opportunisti. Possono quindi essere riscontrati in grande quantità

nelle feci umane e di animali e per questo motivo già da tempo vengono utilizzati come indicatori per rilevare la contaminazione fecale dell'acqua o degli alimenti. Tuttavia, da ricerche condotte recentemente è emerso che gli enterococchi sono diffusi in vari habitat naturali anche in assenza di contributi fecali significativi. Questi habitat extra-enterici includono il suolo e i sedimenti, la sabbia delle spiagge, la vegetazione terrestre e acquatica, e gli ambienti acquatici: mare, torrenti, fiumi e ruscelli. Tali ambienti possono essere considerati habitat eterotermici, caratterizzati da temperature variabili, a differenza del tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo dove invece la temperatura è pressoché costante (Byappanahalli *et al.*, 2012). Oltre alle variazioni di temperatura, quando gli enterococchi si vengono a trovare in un ambiente extra-intestinale come la superficie dell'acqua, del sedimento o della vegetazione acquatica, sono sottoposti a differenti stress biotici e abiotici fra cui: l'esposizione alla luce solare o a sostanze disinfettanti, le variazioni di salinità, la carenza di nutrienti. La luce solare danneggia i microrganismi e il loro DNA direttamente attraverso l'assorbimento dei raggi UV e indirettamente attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Tuttavia il danno foto-ossidativo e il tempo di riduzione della concentrazione batterica in seguito ad irraggiamento



solare varia moltissimo e dipende da numerosi fattori ambientali, tra cui anche la composizione chimica dell'acqua.

La salinità è un altro fattore di stress: gli enterococchi possono sopravvivere e crescere in ambienti marini con una concentrazione più elevata di NaCl (6.5%) rispetto ai coliformi, rendendoli più efficienti come batteri indicatori della balneabilità delle acque marine per valutare il rischio per la salute umana.

La disinfezione delle acque reflue viene praticata per evitare che le acque riceventi vengano contaminate da patogeni o da batteri indicatori fecali; generalmente i coliformi fecali o totali vengono utilizzati per valutare l'efficacia del trattamento di disinfezione, ma secondo alcuni studi sarebbe più opportuno utilizzare il tasso di sopravvivenza degli enterococchi come parametro per predire la sopravvivenza di patogeni (compresi i virus) a trattamenti di disinfezione.

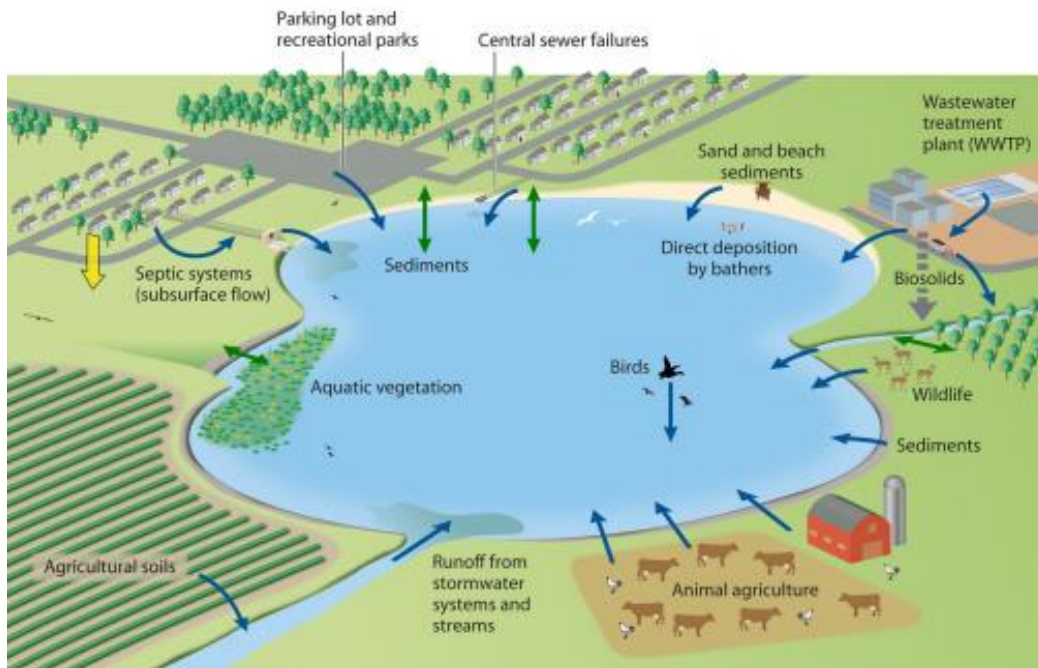
Infine in ambienti acquatici oligotrofici gli enterococchi si trovano esposti alla carenza di nutrienti che rappresenta uno dei principali fattori abiotici che minaccia la loro sopravvivenza. In risposta a queste condizioni, in *E. faecalis* è stata dimostrata la sintesi o la sovra-espressione di proteine che aumentano la resistenza a diversi fattori di stress (Byappanahalli *et al.*,

2012); anche lo stato VBNC può essere indotto in *Enterococcus* spp. dalla carenza di nutrienti (Heim *et al.*, 2002).

La predazione da parte di protozoi e di altri batteri o l'infezione da batteriofagi costituiscono i fattori biotici che sono in grado di controllare le popolazioni batteriche nell'ambiente. È stato stimato che i protozoi sono i responsabili (fino al 90%) della mortalità dei microrganismi autoctoni e alloctoni, in ambiente acquatico, sia marino che di acqua dolce. Batteriofagi che infettano diverse specie di *Enterococcus* sono stati anche recentemente descritti e chiamati “enterofagi” ma i loro effetti sulla sopravvivenza degli enterococchi non è stata approfondita. Sebbene tutti questi fattori di stress influenzino negativamente la sopravvivenza degli enterococchi, molti studi hanno chiaramente dimostrato la natura persistente di alcune specie e ceppi di *Enterococcus* in habitat extra-intestinali, evidenziando la notevole capacità di adattamento di questi microrganismi (Byappanahalli *et al.*, 2012).

La **Figura 2** mostra diverse possibili fonti di contaminazione dei corpi idrici da cui possono derivare gli enterococchi (freccette blu): acque reflue e biosolidi, materiale fecale da bagnanti; deiezioni di animali selvatici o di animali allevati in prossimità di corpi idrici, diffusione di letame nei campi per la concimazione. Il materiale particolato veicolato dall'acqua

piovana può trasportare enterococchi che poi si depositano nei sedimenti. Enterococchi possono anche essere adesi alla vegetazione acquatica e ai detriti. Quando i sedimenti sono disturbati da flussi elevati, come onde, o dall'attività dell'uomo e degli animali, gli enterococchi possono tornare in sospensione nella colonna d'acqua, rendendo i sedimenti una fonte di contaminazione secondaria di enterococchi (frecce verdi). Anche le acque che defluiscono dai campi o le acque dei ruscelli possono costituire delle fonti di contaminazione secondaria. Serbatoi permanenti, dove gli enterococchi si depositano e hanno poche possibilità di essere trasportati di nuovo nell'acqua, sono meno comuni e comprendono i sistemi di smaltimento delle acque reflue o le fosse settiche (freccia gialla) (Byappanahalli et al., 2012).



**Figura 2:** Possibili fonti di contaminazione dei corpi idrici da cui possono derivare gli enterococchi. (Byappanahalli et al., 2012)

## 2. Antibiotico-resistenza

Storicamente, la resistenza agli antibiotici è stata definita da un punto di vista operativo per categorizzare i batteri come resistenti o sensibili in funzione della possibilità di trattare con uno specifico antibiotico le infezioni che causano. Dal punto di vista clinico, secondo l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), “un microrganismo è definito sensibile quando l’attività antimicrobica di un

farmaco nei suoi confronti suggerisce un'alta probabilità di successo terapeutico” e “un microrganismo è definito resistente quando invece l’attività antimicrobica del farmaco nei confronti di quel microrganismo suggerisce un'alta probabilità di fallimento terapeutico” (Martinez, 2014). La scoperta e l'introduzione degli antibiotici nella pratica clinica ha rivoluzionato la medicina moderna, permettendo di trattare infezioni batteriche un tempo incurabili, eseguire interventi medici complessi e prolungare la vita della popolazione globale. Ad oggi, purtroppo, l'aumento della antibiotico-resistenza nei più comuni patogeni batterici compromette il successo terapeutico, e l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera la resistenza agli antibiotici una delle tre minacce più importanti per la salute pubblica del XXI secolo. Si prevede che la resistenza agli antibiotici causerà circa 300 milioni di morti premature entro il 2050. La situazione è aggravata dal fatto che le industrie farmaceutiche non stanno investendo nello sviluppo di nuovi antibiotici, lasciando così i medici senza opzioni sicure per curare i pazienti infetti (Munita & Arias, 2016).

Nei batteri si possono distinguere due tipologie di resistenza agli antibiotici: la resistenza “intrinseca”, che si riferisce alle caratteristiche

naturali dei batteri che li rendono insensibili a certi antibiotici, e la resistenza “acquisita”, che è dovuta a mutazioni cromosomiche (resistenza endogena) o all'acquisizione di nuovi geni derivanti da microrganismi intrinsecamente resistenti presenti nell'ambiente (resistenza esogena) (Courvalin, 2008).

In merito alla “resistenza acquisita”, la resistenza endogena si verifica a seguito dello sviluppo di una mutazione casuale sul cromosoma in una popolazione sensibile; in un gene che interferisce con l'azione del farmaco antimicrobico. Tali mutazioni consentono alle cellule di sopravvivere in presenza della molecola antimicrobica e comporta una selezione: una volta che emergono mutanti resistenti, l'antibiotico elimina la popolazione sensibile permettendo ai batteri resistenti di prevalere. La mutazione viene quindi trasmessa alla progenie.

Nel caso in cui invece la resistenza venga acquisita attraverso il trasferimento genico orizzontale HGT, la strategia più frequentemente utilizzata dai batteri per acquisire materiale genetico esterno è la coniugazione. Questo metodo, molto efficiente, avviene tramite il contatto diretto fra le cellule ed è probabile che si verifichi ad alte frequenze nel tratto gastrointestinale dell'uomo durante il trattamento

antibiotico. L'emergere della resistenza in ambiente ospedaliero spesso coinvolge proprio la possibilità di scambi genetici tra ceppi batterici attraverso la coniugazione. Questa utilizza elementi genetici mobili (MGE), e i più importanti sono i plasmidi e i trasposoni; entrambi giocano un ruolo importante nello sviluppo e nella diffusione della resistenza agli antimicrobici tra batteri di rilevanza clinica.

Le principali strategie utilizzate dai batteri per contrastare l'azione dei farmaci antimicrobici e sopravvivere sono:

- 1) Modifica del bersaglio: che porta alla perdita o alla diminuzione dell'affinità del farmaco per il suo target;
- 2) Inattivazione enzimatica dell'antibiotico;
- 3) Impermeabilità: mediante la diminuzione del numero e/o del diametro dei pori presenti sulla membrana o sugli involucri più esterni della cellula batterica;
- 4) Efflusso: comporta la fuoriuscita degli antibiotici all'esterno delle cellule tramite pompe ATP-dipendenti.

Lo scopo principale di questi vari meccanismi è di ostacolare l'interazione dell'antibiotico con il suo bersaglio (Courvalin, 2008).

Lo sviluppo della resistenza a uno o più antibiotici comporta un costo biologico legato al fatto che i batteri acquisiscono uno o un insieme di geni, le mutazioni che portano alla resistenza possono interessare dei geni essenziali per la crescita e, inoltre, occorre un dispendio energetico aggiuntivo, che a volte può essere significativo, per replicare e mantenere i plasmidi che contengono questi geni.

La prevalenza di ceppi resistenti in una popolazione batterica dipende da diversi fattori come il tipo e la concentrazione di antibiotico, il costo associato alla resistenza a quel particolare antibiotico e la capacità dei batteri di compensare tale costo. Inoltre, la resistenza è necessaria solo temporaneamente per il batterio ospite; pertanto, i geni che la conferiscono vengono attivati solo quando l'antibiotico è effettivamente presente nell'ambiente. Questo è fondamentale per risparmiare energia e permette al batterio di adattarsi a un ambiente che è in rapido cambiamento (Munita & Arias, 2016).

Lo sviluppo della resistenza agli antibiotici rappresenta una risposta adattativa ed evolutiva alla pressione esercitata dal crescente impiego degli antibiotici nella pratica clinica. Man mano che un antibiotico viene commercializzato e somministrato di routine emergono microrganismi resistenti (Munita & Arias, 2016). Poiché la diffusione della resistenza è



direttamente proporzionale alla pressione selettiva esercitata dall'uso degli antibiotici, l'unico modo per contrastare efficacemente questa diffusione è ridurre tale pressione, limitando l'uso eccessivo e non necessario di tali farmaci (Courvalin, 2008).

## **2.1 Antibiotico-resistenza degli enterococchi**

Gli enterococchi sono specie resistenti e adattabili, capaci di sopravvivere in condizioni difficili, il che li rende particolarmente adatti a diffondersi nell'ambiente ospedaliero. Due specie, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, sono responsabili della maggior parte delle infezioni enterococciche umane. Entrambe possiedono una resistenza intrinseca a molti antibiotici comuni come i beta-lattamici e gli aminoglicosidi. In aggiunta, avendo una spiccata plasticità genomica, queste specie possono facilmente acquisire ulteriori resistenze come quella all'ampicillina e alla vancomicina, sia attraverso mutazioni sia tramite il trasferimento orizzontale di specifici geni (García-Solache & Rice, 2019).

### Resistenza ai $\beta$ -lattamici

I  $\beta$ -lattamici sono una classe di antibiotici che impedisce la sintesi della parete cellulare dei batteri attraverso l'inibizione delle transpeptidasi, enzimi che catalizzano la formazione dei legami crociati che rafforzano il peptidoglicano. Le transpeptidasi, bersaglio di questi antibiotici sono anche conosciute come PBP (*penicillin-binding proteins*) per la loro affinità di legame con le penicilline.

Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti alla maggior parte dei  $\beta$ -lattamici. La resistenza a questi antibiotici può essere raggiunta attraverso due principali meccanismi. Il primo, meno rilevante, è la produzione di  $\beta$ -lattamasi: sono stati evidenziati numerosi ceppi di *E. faecalis* che producono questo enzima e l'analisi a livello molecolare ha mostrato che è identico a quello prodotto da *S. aureus*. Sebbene la produzione di  $\beta$ -lattamasi possa compromettere la terapia, l'aggiunta di inibitori specifici può contrastarne l'effetto. La produzione di questi enzimi in *E. faecium* è invece piuttosto rara (García-Solache & Rice, 2019).

Il secondo meccanismo di resistenza implica l'espressione di una PBP specifica nota come PBP4 in *E. faecalis* e PBP5 in *E. faecium*. Queste PBP hanno una bassa affinità per i  $\beta$ -lattamici, il che riduce l'efficacia di questi antibiotici nel bloccare la sintesi della parete cellulare batterica. È stato dimostrato che eliminando i geni che codificano per queste proteine,

i ceppi diventano più sensibili con conseguente riduzione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) per i  $\beta$ -lattamici attivi.

La presenza delle proteine PBP4 e PBP5 è necessaria quindi per la resistenza ai  $\beta$ -lattamici in *E. faecalis* ed *E. faecium* rispettivamente, ma non sono sufficienti da sole per conferire la resistenza. Sono infatti necessarie altre proteine: ad esempio, in *E. faecalis*, il locus regolatore croRS e una serina-treonina chinasi sono essenziali per la resistenza alle cefalosporine e sono richiesti anche i geni *ponA* e *pnbZ* che codificano PBP di classe A.

In *E. faecium*, invece, la delezione delle PBP di classe A aumenta la sensibilità a certe cefalosporine, ma questo fenotipo è instabile e può rapidamente ripristinare la resistenza. La resistenza alle cefalosporine può anche essere dovuta all'espressione di una proteina trovata associata alla PBP5.

In alcuni ceppi di *E. faecium*, dove non c'è il gene *pbp5*, la resistenza all'ampicillina è espressa attraverso un'altra proteina, la L,D-transpeptidasi che non è inibita dalle penicilline ma piuttosto dai carbapenemi.

La resistenza degli enterococchi ai beta-lattamici è quindi un fenomeno complesso che coinvolge diverse proteine e meccanismi genetici, alcuni dei quali non sono ancora completamente compresi (García-Solache & Rice, 2019).

### Resistenza alle tetracicline

La resistenza alle tetracicline è diffusa in molti isolati clinici ed è spesso mediata da un meccanismo di protezione ribosomiale. Questo coinvolge il gene *tet(M)* che codifica per una proteina che si lega al ribosoma batterico, il sito d'azione degli antibiotici di questa classe. Questa proteina interagisce con il ribosoma batterico modificandolo, impedendo all'antibiotico di legarsi efficacemente e riducendo così la sua capacità di inibire la sintesi proteica necessaria per la sopravvivenza batterica. Un altro meccanismo sfruttato per la resistenza alle tetracicline è l'efflusso mediato da proteine codificate da geni come *tet(L)*, che pompano attivamente gli antibiotici fuori dalla cellula batterica, permettendo al batterio di sopravvivere nonostante la presenza dell'antibiotico (García-Solache & Rice, 2019).

### Resistenza ai fluorochinoloni

I fluorochinoloni agiscono su due target batterici principali: gli enzimi DNA girasi e topoisomerasi IV. Tali antibiotici formano complessi con questi enzimi e il DNA bloccando il progredire della forcella di replicazione e, di conseguenza, impedendo la replicazione del DNA (Hooper, n.d.).

Alcuni studi hanno dimostrato che i ceppi di enterococchi che possiedono un'elevata resistenza ai fluorochinoloni hanno mutazioni nei geni *parC* e *gyrA* che codificano le subunità C ed A della topoisomerasi IV e della girasi rispettivamente. In altri ceppi, invece, le mutazioni coinvolgono solo la subunità *parC*. Ci sono anche evidenze che indicano un coinvolgimento delle pompe di efflusso in questo meccanismo di resistenza ma non sono ancora state identificate. Alcuni fluorochinoloni che hanno un utilizzo limitato al trattamento delle infezioni del tratto urinario sono la ciprofloxacina e levofloxacina (García-Solache & Rice, 2019).

### Resistenza agli aminoglicosidi

Gli aminoglicosidi sono antibiotici noti per interferire con la precisione della sintesi proteica dei batteri, legandosi a una specifica regione del ribosoma (Jospe-Kaufman et al., 2020).

Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti alle dosi di aminoglicosidi utilizzate in ambito clinico. Tuttavia, questi antibiotici possono avere un effetto battericida quando utilizzati in combinazione con farmaci che agiscono sulla parete cellulare. L'effetto sinergico, però, può venire meno in presenza di ceppi che esprimono enzimi in grado di modificare gli aminoglicosidi.

Gli aminoglicosidi più comunemente utilizzati includono gentamicina, kanamicina, streptomicina e neomicina. Gli enterococchi hanno sviluppato meccanismi di resistenza differenti per ciascuno di questi antibiotici. Il gene più comune associato alla resistenza alla gentamicina è *aac-6'-Ie-aph-2''*, mentre la resistenza alla kanamicina in *E. faecium* è dovuta a un enzima codificato a livello cromosomico, l'AAC(6')-Ii. La resistenza alla streptomicina è solitamente codificata dal gene *ant-6* o da mutazioni a carico dei ribosomi. Si tratta di enzimi in grado di catalizzare l'aggiunta di gruppi funzionali (per es. mediante reazioni di acetilazione, fosforilazione, adenilazione) all'antibiotico che modificano la sua struttura chimica e dunque la sua attività (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016).

### Resistenza al linezolid

Il linezolid è un antibiotico che agisce inibendo la sintesi proteica ed è efficace sia contro *E. faecium* che *E. faecalis*. Tuttavia, la resistenza a questo farmaco spesso si sviluppa a causa di mutazioni nei geni dell'rRNA. *E. faecium* possiede sei di questi geni, mentre *E. faecalis* ne ha quattro. La resistenza dipende dal numero di geni che contengono le mutazioni. Una volta che si è verificata la mutazione possono accadere due scenari: il primo è che la pressione selettiva esercitata dal linezolid può portare a una “conversione genica”, dove altri geni acquisiscono la stessa mutazione mediante ricombinazione omologa; oppure, il secondo scenario è che se rimane almeno un gene non mutato, la conversione genica può riportare la sensibilità al linezolid quando l'antibiotico non è più presente, suggerendo quindi che vi sia uno svantaggio selettivo per queste mutazioni senza pressione selettiva.

Inoltre, gli enterococchi possono anche sviluppare resistenza al linezolid acquisendo i geni *cfr* o *cfr(B)* che codificano per una metiltrasferasi che modifica un sito peptiditransferasico l'rRNA 23S batterico. I geni *cfr* si trovano spesso su plasmidi che possono essere facilmente trasferiti tra batteri; questa caratteristica favorisce la sua diffusione contribuendo alla comparsa di epidemie da ceppi resistenti al linezolid. Inoltre questi geni conferiscono resistenza ad una varietà di classi di antibiotici inclusi

fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine A e una ridotta sensibilità ai macrolidi a 16 atomi di C spiramicina e josamicina (García-Solache & Rice, 2019).

### Resistenza ai Glicopeptidi

I glicopeptidi agiscono principalmente contro i batteri Gram-positivi inibendo la sintesi della parete cellulare. Tuttavia, un aspetto preoccupante è l'emergere e la diffusione della resistenza a questi antibiotici, che sono stati efficaci per circa 30 anni contro *E. faecalis* ed *E. faecium*. A partire dagli anni '80 sono stati identificati dei ceppi che mostravano una resistenza elevata e inducibile sia alla vancomicina che alla teicoplanina. Questa resistenza si verifica perché gli enterococchi acquisiscono operoni che alterano la struttura dei precursori del peptidoglicano. In particolare, i ceppi resistenti sostituiscono il D-lattato al residuo di D-alanina terminale della catena peptidica di peptidoglicano, riducendo l'affinità degli antibiotici per il loro target (D-Ala-D-Ala).

Durante la sintesi della parete cellulare, un passaggio cruciale è la formazione dei legami crociati tra il terzo e il quarto aa di catene peptidiche adiacenti per conferire stabilità alla struttura. Per ottenere l'energia necessaria per questo processo di transpeptidazione, la D-alanina terminale viene rimossa dalla catena. La vancomicina agisce



legandosi al dimero D-Ala-D-Ala terminale del precursore della parete cellulare, impedendo alle proteine leganti la penicillina (PBP) di accedere al sito di formazione del legame peptidico. Inoltre, a causa delle grandi dimensioni della vancomicina, essa interferisce anche con la reazione di transglicosilazione che è un altro passaggio critico nella sintesi della parete cellulare. La vancomicina si lega ai precursori che terminano con un D-lattato con un'affinità molto minore rispetto a quelli che terminano con la D-alanina, quindi la vancomicina in questi ceppi risulta meno efficace nell'inibire la sintesi della parete cellulare (Ahmed & Baptiste, 2018).

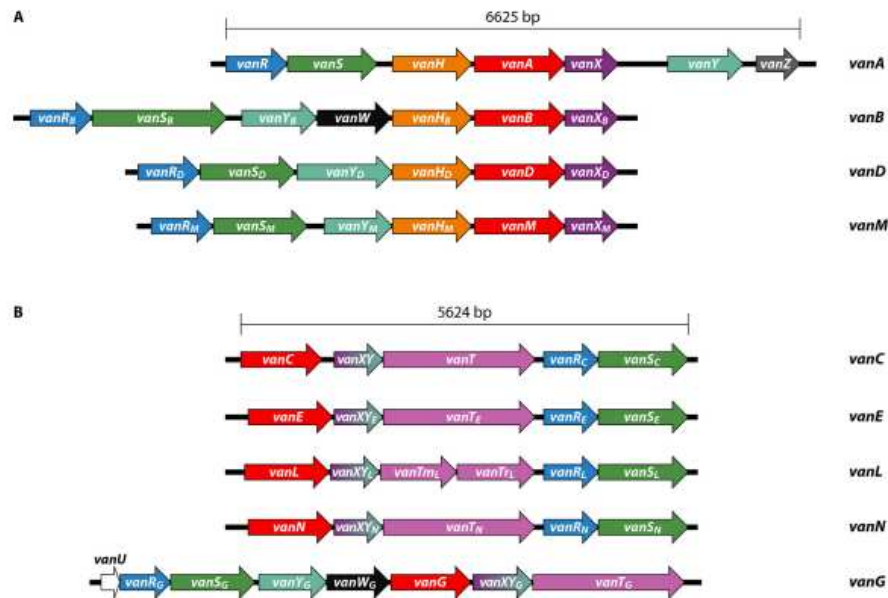
Negli ultimi decenni sono stati descritti nove operoni di resistenza ai glicopeptidi. Essi si dividono in due categorie generali: quelli che sostituiscono il residuo terminale di D-alanina con un residuo di D-lattato (fenotipi vanA, vanB, vanD e vanM) e quelli che sostituiscono la D-alanina con una D-serina (fenotipi vanC, vanE, vanG, vanL e vanN). Gli operoni che portano alla sostituzione della D-Alanina con D-lattato conferiscono la resistenza sia alla vancomicina che alla teicoplanina, mentre gli operoni che codificano per la D-serina terminale, conferiscono livelli relativamente più bassi di resistenza alla vancomicina e sensibilità alla teicoplanina.

Analizzando più nel dettaglio gli operoni più frequenti:

- L'operone più comune in ambito clinico e anche il primo ad essere stato descritto è l'operone *vanA*. Questo operone è composto da sette geni e lo scopo è quello di sostituire il pentapeptide sensibile al glicopeptide (che termina con D-Ala-D-Ala) con un precursore resistente al glicopeptide (che termina con D-Ala-D-Lac). All'interno di questo operone è presente *vanS* che codifica per una chinasi transmembrana capace di rilevare i glicopeptidi presenti nell'ambiente e fosforilare *vanR* che funge da attivatore della trascrizione dell'operone. VanR regola 3 geni a valle: *vanH* (codifica una deidrogenasi che converte il piruvato in lattato), *vanA* (codifica una ligasi che lega la D-alanina al D-lattato per formare D-Ala-D-Lac) e *vanX* (codifica una amidasi che taglia i normali dimeri D-Ala-D-Ala in modo da ridurre le quantità cellulari che potrebbero essere usate per creare precursori di peptidoglicano sensibili alla vancomicina). È inoltre presente il gene *vanY*, che codifica una carbossipeptidasi che taglia la D-alanina terminale dai precursori normali a favorendo ulteriormente la sintesi di precursori modificati insensibili alla vancomicina. L'ultimo gene, *vanZ* codifica per una proteina che contribuisce alla resistenza alla teicoplanina.

L'operone *vanA* è localizzato sul trasposone *Tn1546*, che può trovarsi sia nel cromosoma che su plasmidi trasferibili. (García-Solache & Rice, 2019).

- L'operone *vanB*, situato sul trasposone *Tn5382*, può essere presente o nel cromosoma o in un plasmide. Sebbene abbia una struttura genetica simile a quella del cluster *vanA*, presenta alcune differenze, come il sistema a due componenti, denominato *vanRB* e *vanSB*, che è diverso da quello codificato dall'operone *VanA*. Inoltre, l'operone *vanB* codifica per omologhi di *vanH* e della ligasi *vanA*. La resistenza elevata alla vancomicina è stata segnalata nei sottotipi definiti *vanB1-3* e *vanB-2* (Ahmed & Baptiste, 2018).
- Gli operoni di resistenza *vanC* producono precursori del peptidoglicano che terminano in D-Ala-D-Ser. Questi operoni sono intrinseci alle specie *E. casseliflavus* ed *E. gallinarum*. Si differenziano geneticamente da quello *vanA* e *vanB* (Ahmed & Baptiste, 2018; García-Solache & Rice, 2019).



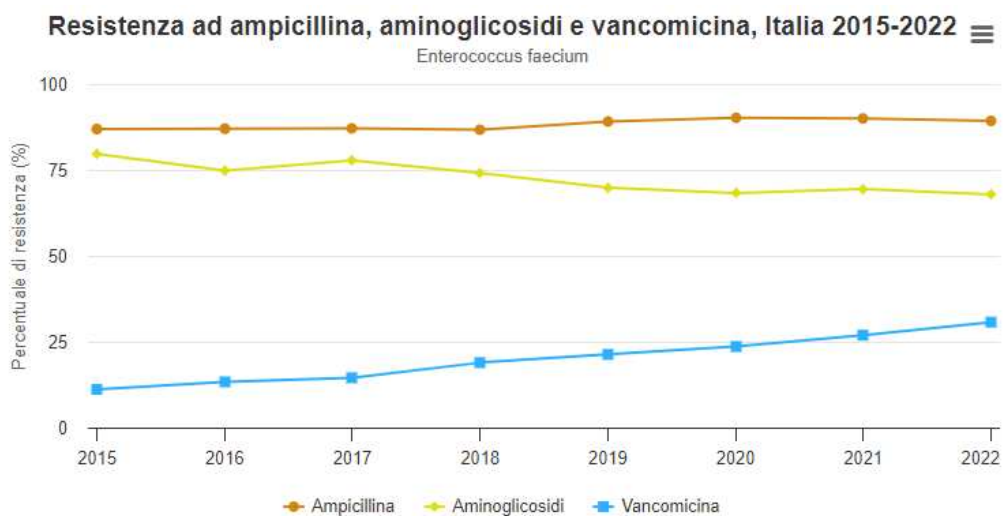
**Figura 3:** A: operoni che producono precursori del peptidoglicano che terminano con D-Ala-D-Lac. B: operoni che producono precursori del peptidoglicano che terminano con D-Ala-D-Lac (García-Solache & Rice, 2019).

Negli ultimi anni, è stato osservato un aumento significativo nella resistenza antimicrobica nella specie *E. faecium*, con implicazioni rilevanti per la gestione delle infezioni nosocomiali.

Dati provenienti dall'Istituto Superiore di Sanità mostrano un quadro preoccupante: mentre la resistenza agli aminoglicosidi ad alto dosaggio è diminuita negli ultimi anni, passando dal 79,7% nel 2015 al 67,9% nel 2022 e mantenendosi poi costante, si continua ad osservare un aumento continuo della percentuale di resistenza alla vancomicina, che è passata

dall'11,1% nel 2015 al 30,7% nel 2022. Inoltre, la resistenza all'ampicillina, un altro antibiotico comunemente usato, è rimasta persistentemente elevata nel corso degli anni, raggiungendo l'89,3% nel 2022 (**Grafico 1**) (Istituto Superiore di Sanità, n.d.).

Queste tendenze evidenziano la necessità di ulteriori ricerche per comprendere al meglio i meccanismi di resistenza e identificare nuovi target terapeutici. La crescente resistenza alla vancomicina, in particolare, rappresenta una minaccia importante perché limita le opzioni terapeutiche per il trattamento delle infezioni da VRE.



**Grafico 1:** Tendenze della resistenza ad ampicillina, aminoglicosidi e vancomicina  
(Istituto Superiore di Sanità, n.d.)

## **2.2 Diffusione ambientale della resistenza**

I geni di resistenza agli antibiotici (ARG) sono presenti in batteri appartenenti a tutti i gruppi tassonomici che si riscontrano in una vasta varietà di ambienti. Quindi potenzialmente qualsiasi ambiente può rappresentare una riserva di geni di antibiotico-resistenza. La resistenza agli antibiotici è un fenomeno naturale che esiste da molto prima del loro utilizzo nella clinica. Sebbene il ruolo di queste molecole in natura non sia stato ben chiarito, si pensa che vengano prodotte dai microrganismi per inibire la crescita di altri microrganismi presenti nella stessa nicchia e possano avere un ruolo nella comunicazione fra cellule batteriche. E' importante notare che le concentrazioni di antibiotici presenti naturalmente nell'ambiente sono di molto più basse rispetto a quelle degli antibiotici sintetici e applicati in clinica e in vari contesti (come in agricoltura o negli allevamenti animali) (Buelow et al., 2021).

La produzione naturale di antibiotici ha probabilmente avuto un ruolo nell'evoluzione dei geni di resistenza agli antibiotici (ARG), ma non è la causa principale della rapida diffusione dei meccanismi di resistenza che si osserva dopo la loro applicazione nell'ambito clinico. Gli antibiotici naturali sono prevalentemente efficaci su piccola scala poiché la loro concentrazione diminuisce rapidamente vicino agli organismi produttori,

limitando così l'esposizione. Al contrario, gli antibiotici sintetici, esercitano pressioni selettive su intere popolazioni microbiche, contribuendo maggiormente alla diffusione della resistenza (Larsson & Flach, 2021).

Per molti anni, gli antibiotici sono stati considerati la soluzione più efficace non solo per trattare le infezioni batteriche nell'uomo, ma anche in altri ambiti come l'agricoltura, l'allevamento, dove sono utilizzati per promuovere la crescita degli animali, e la pesca. La maggior parte degli antibiotici che vengono assunti dagli animali e dall'uomo, non viene però completamente metabolizzata e finisce nell'ambiente. L'uso inappropriato ed eccessivo degli antibiotici nei vari settori, insieme allo smaltimento inadeguato, sta diventando una delle principali cause del cosiddetto "inquinamento da antibiotici", con conseguente aumento delle loro concentrazioni nell'ambiente (Barathe et al., 2024).

Gli antibiotici raggiungono l'ambiente attraverso diverse vie: l'escrezione di urina e feci da parte di esseri umani e animali, lo smaltimento inadeguato di farmaci inutilizzati, la produzione agricola, i rifiuti derivanti dalla produzione di antibiotici e la contaminazione diretta dovuta ad attività di acquacoltura. Tra queste, le fonti principali sono

rappresentate dall'uso e dall'escrezione di questi farmaci (Larsson & Flach, 2021).

L'inquinamento ambientale da antibiotici contribuisce in modo significativo all'aumento e alla diffusione di batteri resistenti a questi farmaci. La loro presenza, infatti, esercita una pressione selettiva sui batteri, inducendoli a sviluppare dei meccanismi di resistenza per adattarsi e sopravvivere, provocando l'emergere della resistenza antimicrobica (AMR). Sembra che le mutazioni indotte da esposizioni a basse concentrazioni di antibiotici siano il fattore principale dello sviluppo della resistenza. Infatti, in presenza di antibiotici, anche a dosi non letali, possono verificarsi delle mutazioni specifiche nei batteri; queste possono accumularsi nel tempo portando alla formazione di ceppi batterici resistenti, che poi risultano difficili da trattare (Barathe et al., 2024). L'adattamento può avvenire anche attraverso l'acquisizione di nuovi elementi genetici. I batteri possiedono diversi elementi genetici mobili (MGE), come plasmidi e trasposoni che favoriscono il trasferimento orizzontale dei geni di resistenza agli antibiotici. È stato evidenziato che gli antibiotici stessi possono stimolare il trasferimento di



questi elementi e la formazione di biofilm (Barathe et al., 2024; Buelow et al. 2021).

L'acquisizione della resistenza agli antibiotici da parte di un patogeno segue generalmente un processo graduale a partire da un gene di resistenza (ARG) situato nel cromosoma. All'inizio, l'ARG immobile può acquisire la capacità di muoversi all'interno del genoma attraverso meccanismi come l'associazione con sequenze di inserzione, formazione di cassette geniche o l'inclusione all'interno di integroni. Il passo successivo implica il trasferimento del gene su un elemento genetico che può spostarsi in modo autonomo tra le cellule, come un plasmide. Il terzo passo è il trasferimento orizzontale del gene di resistenza, che può avvenire direttamente a un patogeno o attraverso ospiti intermedi. L'ultimo passo riguarda il trasferimento fisico del batterio che contiene il gene di resistenza nel microbiota umano o animale. Tutti questi step possono essere promossi dagli antibiotici ma bisogna sottolineare che la maggior parte avvengono anche in assenza di essi (a tassi differenti) (Larsson & Flach, 2021).

Alcuni ambienti sono particolarmente predisposti a favorire il trasferimento degli ARG a causa della presenza di batteri fecali che

trasportano frequentemente questi elementi genetici e alle condizioni ambientali che promuovono tali scambi genetici. La contaminazione ambientale con batteri fecali crea opportunità di contatto tra i batteri presenti nell'ambiente e quelli adattati all'intestino di esseri umani o animali domestici. Molti batteri intestinali hanno plasmidi, sequenze di inserzione, trasposoni o integroni che possono facilitare l'acquisizione e il trasferimento di geni ai patogeni. Ci sono evidenze che dimostrano la loro capacità di acquisire rapidamente determinanti di resistenza dal microbiota ambientale, come quello del suolo (Larsson & Flach, 2021).

I batteri fecali che contengono geni di resistenza una volta rilasciati nell'ambiente potrebbero contribuire al trasferimento orizzontale delle resistenze ai patogeni in grado di infettare gli esseri umani. È però molto più probabile che questi eventi avvengano all'interno del microbiota animale o umano, dove ci sono condizioni che favoriscono l'interazione tra batteri commensali, patogeni e pressioni selettive e dove non ci sono ostacoli ambientali che impediscono il trasferimento dei geni di resistenza (Larsson & Flach, 2021).

L'aumento della frequenza dei geni di resistenza nei batteri ambientali, causato dall'inquinamento, è probabilmente correlato a un maggior

rischio di trasmissione di questi geni ai patogeni. Questo fenomeno è amplificato dalla selezione di ARG e geni di virulenza nelle popolazioni batteriche continuamente esposte a inquinanti e stress ambientali (Buelow *et al.*, 2021).

Ci sono studi che hanno dimostrato che l'esposizione ad acque contaminate da residui fecali costituisce un'importante via per la trasmissione di diverse infezioni. Inoltre, i batteri resistenti possono diffondersi tramite alimenti o superfici contaminate, rappresentando un rischio particolarmente rilevante negli ambienti ospedalieri (Larsson & Flach, 2021).

Gli effetti dell'inquinamento ambientale e il conseguente aumento di batteri patogeni rappresentano una minaccia importante per la salute dell'uomo, dell'ambiente e degli animali. L'impatto di queste problematiche varia molto a seconda del contesto socio-economico. A causa della significativa presenza di antibiotici nell'ambiente è previsto un aumento importante delle malattie infettive causate da batteri resistenti agli antibiotici che avrà delle ripercussioni sulla salute umana e animale, minacciando l'efficacia della medicina moderna e mettendo a rischio la sicurezza alimentare. Dal momento che non ci sono regolamenti per affrontare l'inquinamento da antibiotici e la resistenza antimicrobica, è

necessario sviluppare delle strategie per ridurre e gestire la loro diffusione. E' essenziale comprendere al meglio come gli antibiotici interagiscono con i batteri resistenti e l'ambiente (Barathe et al., 2024).

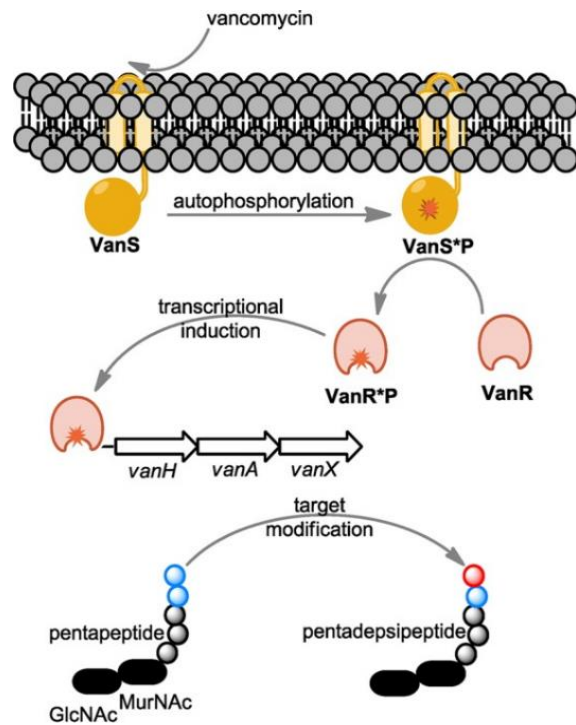
### **2.3 Enterococchi vancomicina-variabili (VVE)**

Gli enterococchi vancomicina variabili (VVE) sono dei ceppi di enterococchi che mostrano un comportamento particolare rispetto alla vancomicina. Questi batteri, pur possedendo il gene *vanA*, che conferisce la resistenza, risultano fenotipicamente sensibili all'antibiotico (VVE-S) a causa del silenziamento del gene. Tuttavia, questi ceppi possono riacquisire la resistenza (VVE-R), a seguito dell'esposizione alla vancomicina, tramite riorganizzazioni genetiche (Wagner et al., 2023).

Allarmante è il fatto che, la conversione dal fenotipo sensibile a resistente nei ceppi VVE può verificarsi nei pazienti durante la terapia antibiotica, aumentando così il rischio di fallimento terapeutico (Thaker et al., 2015).

Attualmente, ci sono state segnalazioni di VVE in diversi Paesi, alcuni di questi sono: Canada, Danimarca, Corea del Sud, India e Australia (Coccitto et al., 2024).

Come detto precedentemente, il principale elemento genetico responsabile della resistenza alla vancomicina negli enterococchi è l'operone *vanA*, localizzato nel trasposone *Tn1546* di 10,8 kb. Tale cluster è composto da sette geni: *orf1* e *orf2*, che sono coinvolti nella trasposizione, *vanH*, *vanA*, *vanX* e *vanY*, che conferiscono la resistenza alla vancomicina, e *vanZ*, che invece interviene nella resistenza alla teicoplanina. Importanti sono due geni: *vanS* e *VanR* che codificano per un sistema di regolazione a due componenti che controlla l'espressione dei geni responsabili della resistenza, attivandoli o disattivandoli in base alla presenza di glicopeptidi nell'ambiente circostante. (Gagnon et al., 2011). La proteina VanS è un'istidina-chinasi associata alla membrana che, una volta rilevata la vancomicina nell'ambiente, avvia un processo di autofosforilazione dipendente dall'ATP. VanS fosforilata trasferisce il fosfato al regolatore di risposta *vanR* che si trova nel citoplasma. A questo punto, *vanR* si lega alla regione intergenica a monte del cluster *vanHAX*, attivando la trascrizione delle proteine coinvolte nella resistenza, ottenendo come risultato finale la formazione di dipeptidi D-Ala-D-Lac nelle catene laterali del peptidoglicano che hanno una ridotta affinità per la vancomicina di circa 1.000 volte rispetto al dimero D-Ala-D-Ala (Thaker et al., 2015).



**Figura 4:** meccanismo di resistenza alla vancomicina (Thaker et al., 2015)

Il trasposone *Tn1546* si trova prevalentemente su plasmidi, e attraverso la coniugazione, la resistenza ai glicopeptidi può essere trasmessa ad altri ceppi sia nell'ambito del genere *Enterococcus* sia, più raramente, ad altri batteri come gli stafilococchi. *Tn1546* presenta una varietà di polimorfismi come inserzioni e delezioni, che si verificano sia all'interno dei geni che nelle regioni intergeniche. La varietà genetica di questo trasposone è dovuta essenzialmente alle sequenze di inserzione (IS) non codificanti e mobili, che possono causare dei cambiamenti strutturali in

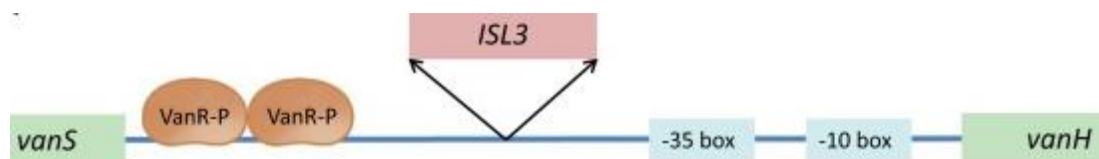
alcune parti del cluster *vanA* portando alla loro parziale o completa perdita (Gagnon et al., 2011).

Gli enterococchi vancomicina-variabili (VVE) sensibili alla vancomicina generalmente contengono i geni *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ*, ma mancano i geni *vanS*, *vanR* e, spesso, anche *orf1* e *orf2*. Ciò conferma che i geni *vanS* e *vanR* sono necessari per l'espressione fenotipica della resistenza (Gagnon et al., 2011).

Questi isolati riescono a crescere, seppure debolmente, su terreno cromogeno Brilliance agar, il che è inaspettato in quanto è specificamente formulato per rilevare enterococchi resistenti alla vancomicina (Szakacs et al., 2014). A causa della loro sensibilità alla vancomicina, i VVE possono non essere rilevati dai tradizionali metodi per gli enterococchi vancomicina resistenti; ciò può portare a una diffusione silente del cluster *vanA* oltre che a fallimenti terapeutici in ambito clinico, nel momento in cui l'infezione causata da un VVE viene trattata con vancomicina (Kohler et al., 2018).

Nella conversione dei VVE da un fenotipo VVE-S a VVE-R intervengono una serie di meccanismi molecolari fra cui: l'eliminazione di sequenze di inserzione (IS) che permettono la riattivazione del promotore o ne forniscono uno funzionante, delezioni di qualche nucleotide nella regione

promotrice e l'attivazione di promotori alternativi per i geni *vanHAX*. Inoltre, un aumento del numero di copie del plasmide contenente il gene *vanA* può rafforzare la resistenza alla vancomicina (Wagner et al., 2023). In alcuni casi, l'unica differenza genetica riscontrata fra i cluster *van* dei VVE sensibili e resistenti è rappresentata da un elemento della famiglia ISL3 a monte di *vanHAX*, che silenzia la trascrizione del cluster nei VVE sensibili. In particolare, l'inserzione di ISL3 tra il sito di legame *vanR* e quello della RNA polimerasi sulla regione del promotore *vanHAX* sembrerebbe responsabile del fenotipo *vanA* silenziato e, durante l'esposizione alla vancomicina, tale fenotipo può essere riattivato a seguito della sua escissione, permettendo così il ripristino del promotore di *vanHAX* e la crescita dei VVE in presenza di vancomicina (Sivertsen et al., 2016).



**Figura 5:** Localizzazione dell'elemento ISL3 a monte di *vanHAX* (Sivertsen et al., 2016)



In altri casi è stata osservata invece, una delezione di 44 bp nella regione del promotore di *vanHAX* che necessita l'attivazione di un promotore alternativo che consenta l'espressione costitutiva del cluster genico e quindi il ripristino della resistenza. Un altro fattore che contribuisce alla transizione da un fenotipo VVE-S a VVE-R è l'aumento del numero di copie del plasmide contenente *vanA* anche di 5 volte (Thaker et al., 2015) e l'aumento del livello di espressione del cluster *vanHAX* (Wagner et al., 2023).

Sicuramente, passare da un fenotipo VVE-S a uno VVE-R comporta un aumento del costo in termini di fitness, il che significa che la resistenza alla vancomicina può essere svantaggiosa. Di conseguenza, in assenza di una selezione esercitata dall'antibiotico, i ceppi tendono a riacquisire la sensibilità (Thaker et al., 2015).

In conclusione, occorre sottolineare che gli enterococchi che non contengono il cluster *vanHAX* intatto (che è essenziale per l'espressione della resistenza) e quindi non sono in grado di tornare resistenti ai glicopeptidi non dovrebbero essere definiti VVE (Sivertsen et al., 2016).

Considerare gli enterococchi vancomicina-variabili come enterococchi vancomicina-sensibili è rischioso dato che potrebbe favorire lo sviluppo (e successivamente la diffusione) di ceppi resistenti alla vancomicina

durante la terapia (Thaker et al., 2015). Per questo motivo, risulta importante che gli enterococchi suscettibili alla vancomicina vengano testati anche tramite PCR per la presenza del gene *vanA* (Sivertsen et al., 2016).

## SCOPO DELLA TESI

Gli enterococchi vancomicino-resistenti (VRE) sono riconosciuti tra i principali patogeni ospedalieri a livello globale. Negli ultimi anni sono stati descritti focolai epidemici causati da enterococchi definiti vancomicina-variabili (VVE) che stanno destando particolare attenzione a causa del loro comportamento nei confronti della vancomicina. Tali ceppi sono rilevanti sia in ambito clinico, poiché la capacità di ripristinare un fenotipo resistente complica il trattamento terapeutico sia nel contesto ambientale, dove possono fungere da serbatoi di geni di resistenza.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare nel dettaglio i meccanismi che portano al ripristino del fenotipo resistente in ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da campioni ambientali. In particolare, dopo aver verificato la presenza del gene *vanA* in ceppi sensibili alla vancomicina è stata valutata la capacità di diventare resistenti e di mantenere stabile tale fenotipo anche in assenza di una pressione selettiva. E' stata valutata, inoltre, la trasferibilità dell'elemento genetico che portava il gene *vanA* e la capacità dei ceppi di formare di biofilm. In ultimo, attraverso il sequenziamento dell'intero genoma, abbiamo cercato di comprendere le modificazioni genetiche alla base del fenotipo sensibile e quelle responsabili del ripristino della resistenza alla vancomicina.

# MATERIALI E METODI

## 1. Ceppi batterici utilizzati

Durante questo studio sono stati utilizzati dei ceppi di *Enterococcus* spp. ottenuti da una campagna di campionamento effettuata nel 2019 in più siti in due aree costiere italiane situate nel Mare Adriatico (nei pressi della foce dei fiumi Esino, Potenza e Musone e davanti all'Ospedale e al porto di Ancona Torrette), e nel Mar Ligure (di fronte al porto e all'Ospedale di Genova).

Sugli isolati ottenuti era stata effettuata precedentemente un'analisi di sensibilità agli antibiotici e in questo lavoro di tesi sono stati selezionati e studiati in maniera più approfondita i ceppi che possedevano il gene di resistenza alla vancomicina *vanA* pur mostrando un profilo di sensibilità alla vancomicina.

Di seguito è mostrata la nomenclatura di riferimento per tali campioni (**Tabella 1**) e, a seguire, sono rappresentati tutti gli isolati di *Enterococcus* spp. analizzati e con le loro caratteristiche di resistenza (**Tabella 2**).

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  (Genova) P: sito 1 Q: sito 2 R: sito 3	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

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

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
KSEG6	> 1024 R	> 32 R	S	S	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
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
CHED1	S	S	S	S	S
CHED2	S	S	64 R	S	S
BESG1	>1024 R	S	S	S	S
BSEG2	>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
ASEF1	S	S	S	S	32 R
ASEF2	S	S	S	S	32 R

ASEF3	S	S	S	S	32 R
BSEF4	S	S	S	S	128 R
BSEF5	S	S	S	S	128 R
ESEF1	S	S	S	S	32 R
ESEF3	S	S	S	S	128 R
ESEF4	S	S	S	S	16 R
ESEF6	S	S	S	S	128 R

**Tabella 2:** Antibiogramma e 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.

Sono stati utilizzati anche i ceppi di riferimento *E. faecalis* V583, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* 64/3 che appartengono alla collezione del laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente dell’Università Politecnica delle Marche.

## 2. Terreni di coltura e antibiotici

I terreni di coltura utilizzati durante questo lavoro di tesi sono i seguenti:

- **Slanetz Bartley (SB):** è un terreno selettivo utilizzato solitamente per l’isolamento ed il conteggio degli Enterococchi. Contiene triptosio che fornisce aminoacidi, vitamine e minerali per la crescita dei microrganismi. La presenza di sodio azide inibisce lo sviluppo di batteri Gram-negativi. Gli enterococchi sono in grado di ridurre il

Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC) presente nel terreno e la reazione è visibile dalla formazione di colonie rosse.

- **Brain Heart Infusion agar (BHIA) e Brain Heart Infusion Broth (BHIB):** sono terreni di coltura impiegati per la crescita di una grande varietà di microrganismi. Contengono l'infuso di cuore e cervello, digerito pancreatico e peptico, glucosio e cloruro di sodio. I peptoni contenuti nell'infuso forniscono carbonio, zolfo, vitamine e altri nutrienti utili per la crescita dei microrganismi.
- **Mueller Hinton II (MHII) agar e Mueller Hinton II (MHII) Broth:** è il terreno abitualmente utilizzato per i test di sensibilità agli agenti antimicrobici di batteri aerobi a crescita rapida o anaerobi facoltativi, come stafilococchi, enterococchi, *Enterobacteriaceae* e aerobi Gram-negativi (*Pseudomonas spp.*). Mueller Hinton II Agar, oltre all'estratto di carne, amido e caseina contiene una bassa concentrazione di timina e timidina e un livello controllato di calcio e magnesio.
- **Tryptic Soy Broth (TSB):** è un terreno di coltura che favorisce la crescita di una vasta gamma di microrganismi, sia aerobi che anaerobi

facoltativi. In questo mezzo, la caseina e gli enzimi digestivi forniscono aminoacidi e sostanze azotate, mentre il glucosio costituisce la principale fonte di energia. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico e il fosfato di potassio bibasico stabilizza e controlla il pH.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti antibiotici:

- **Vancomicina:** è un farmaco antibiotico che fa parte, insieme con la teicoplanina, della classe dei glicopeptidi. Esercita la sua azione antibiotica inibendo la sintesi del peptidoglicano nei batteri Gram-positivi;
- **Rifampicina:** è 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;
- **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 la sintesi proteica nei batteri.

### **3. Estrazione del DNA batterico**

Al fine dello svolgimento della PCR, è stata eseguita un'estrazione del DNA batterico totale utilizzando il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma). I ceppi batterici sono stati inizialmente inoculati in brodo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37°C. Successivamente le brodoculture ottenute sono state prima centrifugate (13.000 x g per 2 minuti), i pellet risospesi in 200µl di Lysozyme Solution contenente lisozima (Sigma) alla concentrazione finale di 45 mg/ml, e incubati a 37°C per 1 ora. Al termine, per digerire le proteine, sono stati aggiunti 200µl di Lysis Solution e 20µl di Proteinasi K (20mg/ml) (Sigma). I campioni sono stati quindi mantenuti a 55°C per 10 minuti. Successivamente, al lisato cellulare sono stati aggiunti 200µl di etanolo (96%) e, dopo aver mescolato per inversione i campioni, l'intera soluzione è stata trasferita nelle colonnine poste all'interno di provette eppendorf da 1,5 ml e centrifugate a 6.500 x g per 1 minuto. La membrana delle colonnine è stata lavata due volte aggiungendo 500µl di Wash Solution e centrifugando a 6.500 x g per 1 minuto dopo il primo lavaggio

e a 12.000 x g per 3 minuti dopo il secondo. Infine, le colonnine sono state trasferite in nuove eppendorf e sono stati aggiunti 200µl di Elution Solution e sono state sottoposte a centrifugazione a 6.500 x g per 1 minuto. Questo ultimo step di eluizione è stato ripetuto una seconda volta per migliorare la resa dell'estrazione. Il DNA estratto è stato quantizzato al nanodrop e conservato a -20°C.

#### **4. Saggi di PCR**

La PCR (*polymerase chain reaction*) è una tecnica che consente di ottenere migliaia di copie di uno specifico tratto di DNA di cui si conosce la sequenza nucleotidica. Dopo aver estratto il DNA questo viene aggiunto ad una miscela di reazione costituita da un tampone contenente desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, specifiche brevi sequenze di oligonucleotidi che fungono da innesco della reazione (primer) e la Taq polimerasi.

I campioni vengono quindi caricati in un termociclatore (MiniAmp Plus Thermal Cycler) in cui avviene la reazione di amplificazione del DNA. Sono previste tre fasi. Inizialmente, i campioni vengono esposti ad una temperatura compresa tra 94-95°C (fase di denaturazione) per consentire

la separazione dei filamenti di DNA. La temperatura viene abbassata fino 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, 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. Per ottenere gli amplificati è stato utilizzato come enzima la DreamTaq polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

I prodotti di amplificazione sono stati separati utilizzando l'elettroforesi in gel di agarosio (1-1,5%) in tampone TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) con l'aggiunta dell'agente intercalante GelRed e applicando una corrente di 80V per circa 1 ora. Come standard di peso molecolare è stato utilizzato il GeneRuler 100bp DNA ladder (ThermoFisher Scientific).

La PCR è stata effettuata, inizialmente, per la ricerca dei geni di resistenza alla vancomicina *vanA* e *vanB* utilizzando le coppie di primers e le condizioni indicate in **tabella 3**. I ceppi che possedevano il gene *vanA*

sono stati, in seguito, identificati grazie all'utilizzo di una PCR specie-specifica per il gene *ddl* di *E. faecium* e *E. faecalis* utilizzando le condizioni e le coppie di primers descritte in **Tabella 3**.

Target	Primer (5'-3')	Lunghezza amplificato (bp)	Condizioni di amplificazione	C+
<i>vanA</i>	F-vanA1 5'GGGAAAACGACAATTGC	738	94°C 4'	KSEG2
	R-vanA2 5'GTACAATGCGGCCGTTA		94°C 30" 60°C 30" X30 72° 1'	
<i>vanB</i>	F-vanB1 5'ATGGGAAGCCACAGTC	635	72° 7'	<i>E. faecalis</i> V583
	R-vanB2 5'GATTTTCGTTCTCGACC		94°C 4' 94°C 30" 50°C 30" X30 72° 1'	
<i>ddl E. faecium</i>	F- GCGTGCATGGTTAAGACGA	472	72° 7'	<i>E. faecium</i> 64/3
	C R- CTGCTGGATCGCTGGGTTAT		95°C 30" 59°C 30" x30 72°C 30"	
<i>ddl E. faecalis</i>	S1-ATCAAGTACAGTTAGTCT	907	95°C 30"	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
	S2- ACGATTCAAAGCTAACTG		52°C 30" x30 72°C 1"	

**Tabella 3:** primer e condizioni utilizzate per la ricerca dei geni target.

## 5. Determinazione della MIC in brodo

La Concentrazione Minima Inibente (MIC) rappresenta la concentrazione più bassa di un antibiotico in grado di inibire la crescita visibile di un ceppo batterico *in vitro*. Viene determinata utilizzando la tecnica della



microdiluzione in brodo utilizzando piastre microtiter da 96 pozzetti in cui sono presenti concentrazioni scalari di antibiotico. Gli antibiotici vengono preparati a una concentrazione doppia rispetto a quella più alta che deve essere saggiata preparando una diluizione dell'antibiotico in un volume opportuno di brodo Mueller Hinton II partendo dallo stock iniziale. Nella piastra microtiter, le righe corrispondono ai ceppi che verranno testati, mentre, in colonna ci sono le varie diluizioni dell'antibiotico espresse in  $\mu\text{g/ml}$ . Vengono dispensati  $100\mu\text{l}$  della soluzione di antibiotico 2x in tutti i pozzetti della prima colonna. Successivamente, partendo dall'ultima colonna e arrivando fino alla seconda, vengono inoculati  $50\mu\text{l}$  di brodo MH II. Quindi dalla prima colonna si prelevano  $50\mu\text{l}$  e si inoculano nel pozzetto successivo proseguendo fino ad arrivare al penultimo, al fine di allestire le diluizioni scalari dell'antibiotico lungo ogni riga. L'ultima colonna della piastra viene lasciata senza antibiotico, come controllo di crescita dei ceppi.

I ceppi da testare dopo crescita overnight a  $37^{\circ}\text{C}$  in SB vengono standardizzati in brodo MH II mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di  $625\text{nm}$  e aggiustando la densità ottica delle colture batteriche fino a 0.1 che corrisponde ad una concentrazione di circa  $10^8$  UFC/ml. La sospensione batterica standardizzata ottenuta

viene diluita 1:100. Infine, in ogni riga della piastra precedentemente allestita vengono distribuiti 50 µl della coltura standardizzata. Nella piastra, oltre ai ceppi da testare, viene inoculato anche un ceppo di controllo (*E. faecalis* ATCC 29212) per assicurarsi che la procedura sia stata eseguita correttamente ed i risultati ottenuti attendibili. La piastra microtiter viene infine incubata per 24 ore a 37 °C e successivamente si va a determinare la minima concentrazione inibente corrispondente al primo pozzetto (minima concentrazione dell'antibiotico) in cui non si osserva più crescita. Per l'esecuzione della procedura e l'interpretazione dei risultati si fa riferimento al CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Se i valori di MIC dei ceppi di controllo ricadono nei range riportati nelle tabelle di riferimento, le MIC dei ceppi esaminati possono essere ritenute valide.

## **6. Determinazione della MIC in agar**

Per la determinazione della MIC in agar si utilizzano delle piastre di MHII agar addizionate con concentrazioni scalari di vancomicina (8-128 µg/ml). Inizialmente occorre preparare soluzioni di antibiotico a diverse concentrazioni che successivamente vengono addizionate al terreno agarizzato raffreddato a 50°C per ottenere una serie di piastre con

concentrazioni scalari di antibiotico. Quindi, si versa l'agar con l'antibiotico nelle piastre Petri sterili e si lascia solidificare.

La sospensione batterica viene preparata e standardizzata come per la MIC in brodo precedentemente descritta. Infine, si prelevano 10 $\mu$ l dell'1:10 della sospensione batterica appena standardizzata e si inoculano, per spot, in ogni piastra. I ceppi vengono anche inoculati in una piastra che contiene solo MHII come controllo di crescita in assenza di antibiotico. Le piastre vengono messe ad incubare per 24h a 37°C e al termine, si va a determinare la MIC. In questo caso, la MIC corrisponde alla concentrazione di antibiotico più bassa presente nella piastra in cui non è visibile crescita batterica.

## **7. PFGE**

La Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) è la tecnica “gold standard” per la tipizzazione degli isolati batterici. Il metodo prevede l'utilizzo di enzimi di restrizione che producono frammenti di DNA di grandi dimensioni. Questi vengono separati usando una camera elettroforetica in campo pulsato che li sottopone a un campo elettrico che inverte direzione ad intervalli regolari costringendo le molecole di DNA a riorientarsi continuamente favorendo la loro separazione attraverso le maglie del gel.

In questo lavoro per la tipizzazione dei ceppi di *Enterococcus* spp. è stato utilizzato l'enzima di restrizione SmaI per l'analisi dell'intero genoma e la nucleasi S1 per l'analisi plasmidica. L'enzima SmaI è un'endonucleasi che riconosce e taglia una sequenza di DNA specifica che permette la creazione di profili di restrizione utili per capire se i ceppi appartengono allo stesso clone epidemico attraverso il confronto fra i vari pattern ottenuti dall'elettroforesi. L'enzima S1, invece, taglia il DNA a doppio filamento in modo non specifico ed è capace di linearizzare i plasmidi circolari permettendo di determinare la presenza, il numero e le dimensioni dei plasmidi.

Inizialmente è stata allestita una coltura *overnight* in brodo BH. Il giorno successivo le colture sono state diluite per avere una concentrazione di DNA di 10 µg/ml; le colture sono state, poi, centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato in seguito risospeso in 1ml di tampone TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 10 Mm pH 8, NaCl 1M) e centrifugato a 5000 rpm per 10 minuti. In seguito, il pellet è stato risospeso in 0.5 ml di tampone TEN al quale sono stati aggiunti 0.5 ml di agarosio low melting all'1.6%. La sospensione batterica così ottenuta, mescolata all'agarosio, è stata introdotta in appositi stampi, *plug-mold*, per la creazione delle plug e lasciate solidificare a 4°C per 15 minuti. Le plug

sono state incubate per 24h a 37°C in un 5 ml di soluzione di lisi contenente 100 µg/ml di lisozima e 50 µg/ml di RNasi. Al termine dell'incubazione, la soluzione di lisi è stata sostituita con la soluzione di digestione contenente 0.5 mg/ml di proteinasi K e i campioni erano mantenuti a 50°C per 48 ore. Al termine della digestione le plug sono state lavate 4 volte in 5 ml di TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM pH 8). Infine, il DNA presente in mezza plug è stato digerito con gli opportuni enzimi di restrizione: 30 U (10U/µL) di SmaI (Roche) o 10U (10U/µL) di S1-nucleasi (ThermoFisher Scientific) e la digestione è avvenuta *overnight* a 25°C per l'enzima SmaI, e per 25 minuti a temperatura ambiente per la nucleasi S1. La digestione è stata bloccata aggiungendo 0,5 ml di EDTA 0.5M pH 8 per 5 minuti. E' stato preparato il gel di agarosio all'1% in 110 ml di Buffer TBE 0.5X (Tris 0,1 M, acido borico 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 8) per la corsa delle plug digerite. Sul gel sono stati caricati i campioni e i marker di peso molecolare: Low Range PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, USA) e il Lambda PFG Ladder Marker (Promega, Madison, USA).

Infine, il gel è stato posto nella camera elettroforetica ed è stato aggiunto il tampone di corsa TBE 0.5X.

La temperatura a cui è stata svolta la corsa è di 14°C. I due enzimi richiedono due differenti programmi di corsa che sono riportati nella **tabella 4**.

	<b>SmaI</b>	<b>S1</b>
<b>Gradiente elettrico</b>	6 V/cm	6 V/cm
<b>Tempo di corsa</b>	22 ore	18 ore
<b>Angolo incluso</b>	120°	120°C
<b>Switch iniziale</b>	0.5''	0.5''
<b>Switch finale</b>	30''	22''
<b>Ramplng factor</b>	Lineare	Lineare

*Tabella 4: programma di corsa SmaI-PFGE e S1-PFGE*

La corsa si è svolta utilizzando lo strumento Chef Mapper XA System (Biorad).

Una volta terminata la corsa il gel è stato immerso per 1 ora in una soluzione contenente bromuro di etidio (0,5 mg/ml) per la colorazione poi, per 10 minuti, in acqua deionizzata. Grazie all'utilizzo del transilluminatore sono state visualizzate le bande.

## 8. Saggi di produzione di biofilm

Per valutare se i ceppi fossero produttori di biofilm è stato utilizzato il metodo in micropiastra basato sulla colorazione con il cristalvioletto descritto da Stepanovic *et al.* 2000. I ceppi sono stati inizialmente inoculati in 5ml di TSB+1% di glucosio e incubati a 37°C overnight. Il giorno successivo, sono stati portati ad una densità ottica di 0.1 ( $\lambda=650$  nm) e 200 $\mu$ l sono stati dispensati in triplicato in una piastra microtiter 96-well a fondo piatto (con i rispettivi bianchi costituiti da solo terreno). La piastra è stata poi incubata overnight a 37°C. Il giorno successivo è stato rimosso il terreno e sono stati eseguiti tre lavaggi con acqua deionizzata sterile e la piastra è stata posta in stufa per 45 minuti a 60°C. Quindi è stata eseguita la colorazione con cristalvioletto all'1% (200 $\mu$ l per pozzetto) e la piastra è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. Il cristalvioletto è stato rimosso e i pozzetti lavati con 200 $\mu$ l di acqua deionizzata sterile. La decolorazione è stata in seguito effettuata con 200 $\mu$ l di etanolo al 96% per 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente e la lettura (590nm) è stata effettuata al lettore di piastra FLUOStar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Germania).

Una volta ottenuti i dati delle letture si procede alla classificazione del ceppo testato (forte, moderato, debole, non produttore) secondo i seguenti passaggi:

- Calcolare media (M) e deviazione standard (DS) dei triplicati di ciascun campione e del relativo bianco.
- Calcolare il valore soglia di OD (ODC):  $M + 3 \cdot DS$  del bianco.
- Calcolare  $2 \cdot ODC$  e  $4 \cdot ODC$ .

Il ceppo testato si considera come forte produttore di biofilm se  $OD > 4 \cdot ODC$ , moderato produttore se  $2 \cdot ODC < OD < 4 \cdot ODC$ , debole produttore se  $ODC < OD < 2 \cdot ODC$  e non produttore se  $OD < ODC$ . Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo forte produttore di biofilm di *S. epidermidis* RP62A.

## **9. Saggi di coniugazione *in vitro***

Tramite la coniugazione *in vitro* è stata valutata la capacità dei ceppi *wt* e revertenti di trasferire il gene *vanA* al ceppo ricevente *E. faecium* 64/3 sensibile alla vancomicina e resistente a rifampicina e acido fusidico. Dopo crescita *overnight* dei ceppi donatori e riceventi viene effettuato un sub-inoculo in 10 ml di BHI brodo fino al raggiungimento della fase



logaritmica. Dopo aver montato l'apparato di filtrazione sterile, viene filtrato 1ml di brodocoltura contenente il donatore e 1ml di brodocoltura contenente il ricevente attraverso filtri in nitrocellulosa da 0,22 $\mu$ m. Utilizzando delle pinze sterili, viene prelevato il filtro e posizionato al centro di una piastra di BHI agar e le piastre vengono messe ad incubare overnight a 37°C in termostato.

Il giorno seguente i filtri vengono risospesi in 10 ml di soluzione fisiologica sterile in modo da staccare la patina microbica presente sul filtro; il filtro viene poi eliminato e la sospensione viene centrifugata per 10 minuti a 10.000 x g. A questo punto il sovrantante viene eliminato ed il pellet risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. Successivamente vengono allestite delle diluizioni seriali (1:10) in soluzione fisiologica sterile che vengono opportunamente seminate su terreni selettivi. Per la selezione dei donatori sono state utilizzate piastre di SB contenenti 4 $\mu$ g/ml di vancomicina e per la selezione dei riceventi piastre contenenti 25  $\mu$ g/ml di acido fusidico e 25  $\mu$ g/ml di rifampicina. Gli eventuali transconiuganti sono stati piastrati in SB addizionato di 4  $\mu$ g/ml di vancomicina, 25 $\mu$ g/ml di rifampicina e 25  $\mu$ g/ml di acido fusidico.

Infine, le piastre sono state incubate a 37°C. Il giorno seguente vengono contate le 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, la frequenza di trasferimento per cellula ricevente viene calcolata con la seguente formula:

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

I transconiuganti vengono poi confermati attraverso il confronto dei profili elettroforetici ottenuti mediante SmaI-PFGE che devono risultare uguali o strettamente correlati al profilo del ricevente, e diverso da quello del donatore.

## **10. Sviluppo *in vitro* della resistenza alla vancomicina**

Per valutare la capacità degli isolati vancomicina-sensibili di ritornare ad un fenotipo resistente è stata eseguita la procedura descritta da Coccitto *et al.* con alcune modifiche.

Sono stati effettuati dei passaggi in BHI brodo e BHI agar con concentrazioni crescenti di vancomicina (0.12-64 µg/ml). Inizialmente i ceppi sono stati inoculati in BH brodo addizionato con vancomicina a una concentrazione di 0.12 µg/ml e l'incubazione è stata effettuata a 37°C in agitazione fino al raggiungimento della densità ottica di 0.8 (fase logaritmica). Successivamente sono stati piastrati 10 µl in BHI agar contenente una concentrazione di vancomicina doppia rispetto alla precedente utilizzata (0.25 µg/ml) e le piastre sono state messe ad incubare *overnight* a 37°C. Il giorno seguente, una colonia è stata inoculata in BH brodo contenente la medesima concentrazione di vancomicina (0.25 µg/ml) fino a raggiungere una OD<sub>650</sub> di 0.8. Successivamente 10 µl sono stati piastrati in BHI agar contenente una concentrazione di vancomicina doppia rispetto alla precedente utilizzata (0.5 µg/ml). Il procedimento è stato ripetuto per dieci passaggi fino ad ottenere colonie in grado di crescere alla concentrazione massima di 64 µg/ml di vancomicina. Ad ogni passaggio, alcune delle colonie cresciute in piastra dopo 24 ore sono state stoccate in glicerolo al 20% a -80°C. I possibili revertenti sono stati poi verificati tramite test di sensibilità alla vancomicina e saggi di PCR.

## **11. Valutazione della stabilità del fenotipo di resistenza alla vancomicina**

La stabilità della resistenza alla vancomicina è stata valutata mediante passaggi seriali (10 giorni) dei revertenti in BHI agar in assenza di antibiotico. Ad ogni passaggio alcune colonie cresciute sono state congelate a -80°C in BH addizionato di glicerolo (20%). Inoltre dopo ogni passaggio, alcune colonie scelte a caso sono state selezionate e testate per valutare la sensibilità alla vancomicina e la presenza del gene *vanA* mediante PCR. I mutanti sono stati poi analizzati tramite SmaI-PFGE per confermare la loro correlazione con i rispettivi revertenti.

## **12. Induzione della resistenza alla vancomicina**

L'espressione costitutiva o inducibile della resistenza alla vancomicina è stata verificata tramite saggi MIC con o senza induzione di vancomicina e tramite qPCR.

I revertenti selezionati e il ceppo *wild type* sono stati inoculati in presenza di concentrazioni sub-MIC di vancomicina (rispettivamente 8 µg/ml e 0.5 µg/ml) in 5 ml di BHI brodo ed incubati overnight a 37°C. E' stata poi testata la sensibilità alla vancomicina tramite saggi di microdiluzione in

brodo ed effettuata una Real Time qPCR per determinare il numero di copie del gene *vanA* nei ceppi indotti e non indotti.

### 13. Valutazione del numero di copie del gene *vanA* mediante qPCR

Sono stati eseguiti saggi qPCR per determinare il numero di copie del gene *vanA* presenti sul plasmide come descritto da Coccitto *et al.* Brevemente, dopo estrazione del DNA è stata allestita una reazione di qPCR in triplicato come indicato in **Tabella 5**.

MIX DI REAZIONE		
	Concentrazione	Volume
Primer (100 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M	0.04 $\mu$ L
Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix (2X)	1X	10 $\mu$ L
DNA	15ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	/	7.92 $\mu$ L
Volume TOT		20 $\mu$ L

**Tabella 5:** Mix di reazione utilizzato per la qPCR.

Le condizioni di amplificazione erano 95 °C per 5 minuti, seguiti da 35 cicli di 94 °C per 10 s, 63 °C per 30 s e 72 °C per 20 s. Per quantificare il

numero di copie del plasmide *vanA*, è stata costruita una curva di calibrazione utilizzando diluizioni scalari (da  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$  ng/reazione) dell'amplicone *vanA*. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Rotor Gene Q Series di Qiagen. Le copie plasmidiche sono state calcolate in base alle dimensioni dell'amplicone *vanA* (196 bp) e al peso di 1 bp ( $1,095 \times 10^{-12}$  ng). I risultati sono riportati come media di tre repliche biologiche in tre saggi qPCR  $\pm$  deviazione standard (SD).

## **14. Sequenziamento WGS (Whole Genome Sequencing) e analisi bioinformatica**

Il DNA genomico batterico è stato sottoposto a sequenziamento (WGS) con un metodo ibrido che utilizza sia il sequenziamento short-read (piattaforma Illumina MiSeq) con un approccio paired-end  $2 \times 150$  bp, sia il sequenziamento long-read (MinION, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Regno Unito).

L'assemblaggio ibrido è stato eseguito con Unicycler v.0.4.8 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). L'analisi *in silico* dei dati WGS per l'identificazione dei geni di resistenza antimicrobica acquisiti e dei fattori

di virulenza, le correlazioni filogenetiche e i tipi di repliconi plasmidici sono stati eseguiti utilizzando gli strumenti dedicati disponibili sul sito “Center for Genomic Epidemiology”, all'indirizzo <https://www.genomicepidemiology.org/> (ResFinder 4.1, VirulenceFinder 2.0, CSI Phylogeny 1.4 e PlasmidFinder 2.1) e dal sito BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

# RISULTATI

## 1. Selezione e caratterizzazione dei ceppi vancomicina-sensibili

È stato effettuato uno screening, attraverso la PCR, per la ricerca del gene *vanA*.

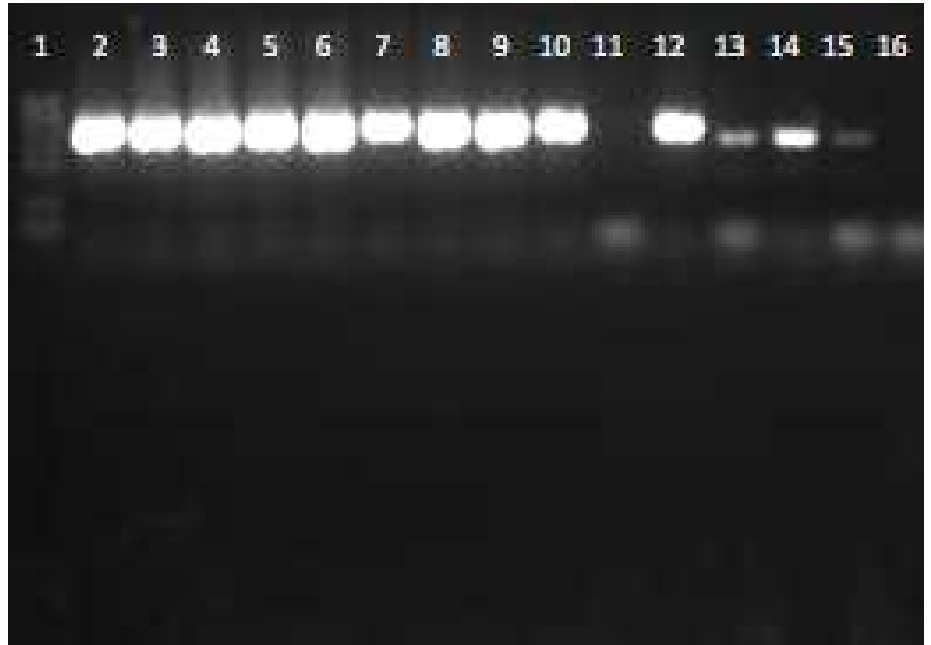
Dei 156 ceppi testati, 12 sono risultati *vanA*-positivi e sono riportati nella **tabella 6**.

<b>Ceppi</b>	<b>Sito di campionamento</b>	<b>Campione</b>	<b>PCR (<i>vanA</i>)</b>
ASEA1	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA2	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA3	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA4	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA5	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA6	Potenza sud	sedimento	positivo
ASEA7	Potenza sud	sedimento	positivo
JSEG15	Esino nord	sedimento	positivo
JSEG4	Esino nord	sedimento	positivo
JSEG2	Esino nord	sedimento	positivo
PSEG8	Sito 1 (Genova)	sedimento	positivo

**Tabella 6:** ceppi positivi al gene *vanA*



1. Marker (100bp ladder)
2. C+
3. ASEA1
4. ASEA2
5. ASEA3
6. ASEA4
7. ASEA5
8. ASEA6
9. ASEA7
10. AZEA1
11. NSEG12
12. JSEG15
13. JSEG4
14. JSEG2
15. PSEG8
16. C-



**Figura 6:** elettroforesi in gel d'agarosio (1%) degli amplificati ottenuti dalla PCR per il gene *vanA*.

Nessun ceppo è risultato, invece, è risultato positivo al gene di resistenza alla vancomicina *vanB*. È stata poi valutata la sensibilità dei ceppi *vanA*-positivi alla vancomicina attraverso la determinazione della MIC (**Tabella 7**).

Solamente 4 dei 12 ceppi *vanA*-positivi erano sensibili alla vancomicina, con valori di MIC compresi tra 1 e 4 µg/ml (evidenziati in giallo nella **Tabella 7**): JSEG15, JSEG4, JSEG2, PSEG8.

<b>Ceppi</b>	<b>MIC vancomicina (µg/ml)</b>
ASEA1	128
ASEA2	>128
ASEA3	128
ASEA4	128
ASEA5	>128
ASEA6	>128
ASEA7	>128
<b>JSEG15</b>	<b>4</b>
<b>JSEG4</b>	<b>1</b>
<b>JSEG2</b>	<b>1</b>
<b>PSEG8</b>	<b>1</b>

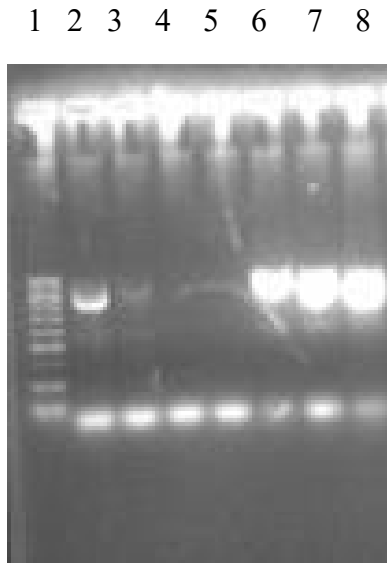
**Tabella 7:** determinazione della MIC dei ceppi vanA-positivi

Ceppi	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Rifampicina	Acido fusidico
JSEG2	0.5	4
JSEG4	0.25	4
PSEG8	1	4
JSEG15	32	4

**Tabella 8:** determinazione della MIC alla rifampicina e all'acido fusidico sui possibili donatori

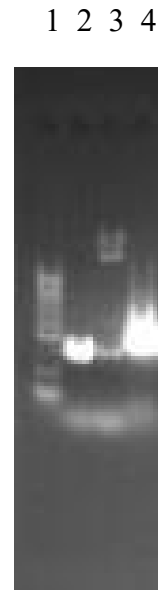
## 2. Identificazione dei ceppi

I ceppi sono stati, inizialmente, identificati a livello di specie mediante PCR utilizzando primer specie-specifici ed è emerso che JSEG2, JSEG4, PSEG8 appartenevano alla specie *E. faecalis* (rispettivamente nelle posizioni 6, 7, 8 del gel nella **Figura 7**) mentre JSEG15 alla specie *E. faecium* (posizione 4 del gel nella **Figura 8**).



**Figura 7:** PCR specie-specifica per *E. faecalis*

1. Marker 100bp
2. C+ *E. faecalis* ATCC 29212
3. C+ *E. faecalis* ATCC 29212
4. H<sub>2</sub>O
5. JSEG15
6. JSEG4
7. JSEG2
8. PSEG8



**Figura 8:** PCR specie-specifica per *E. faecium*

1. Marker 100bp
2. C+ *E. faecium* DPG 1146
3. C+ *E. faecium* 64/3
4. JSEG15

### 3. Tipizzazione

I ceppi sono stati tipizzati tramite SmaI-PFGE per valutare la correlazione genetica e analizzati mediante S1-PFGE per determinare l'eventuale presenza, numero e dimensioni dei plasmidi.

La SmaI-PFGE metteva in evidenza la presenza di 3 pulsotipi differenti indicati come A, B, C (**Tabella 9**). JSEG2 e JSEG4 appartenevano allo stesso pulsotipo (A) ed erano pertanto strettamente correlati; verosimilmente erano ceppi identici essendo stati isolati dallo stesso sito e campione. I ceppi PSEG8 e JSEG15 presentavano invece profili differenti per cui sono stati associati a singoli pulsotipi, rispettivamente B e C (**Tabella 9**).

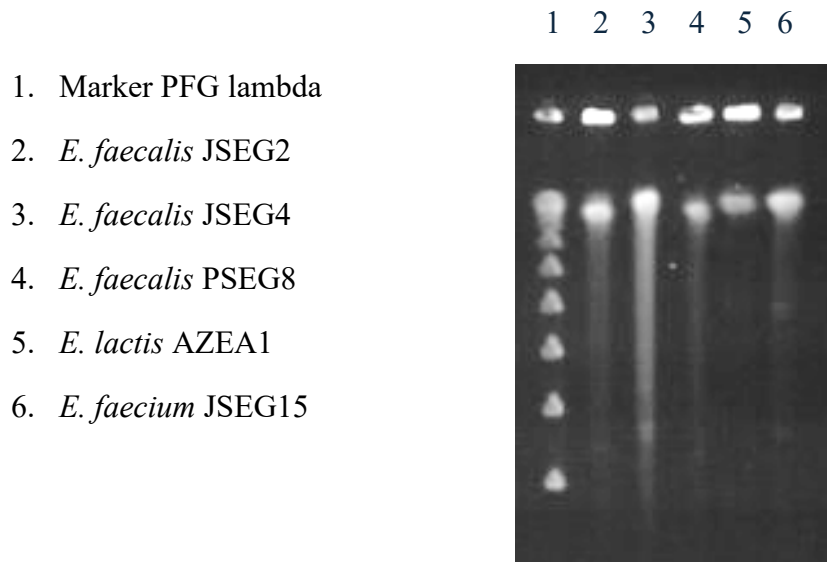
<b>Ceppi</b>	<b>Pulsotipo</b>
<i>E. faecalis</i> JSEG2	A
<i>E. faecalis</i> JSEG4	A
<i>E. faecalis</i> PSEG8	B
<i>E. faecium</i> JSEG15	C

**Tabella 9:** SmaI-PFGE

Dall'analisi S1-PFGE è emerso che *E. faecalis* JSEG2 e JSEG4 possedevano un plasmide di ~50Kb; *E. faecalis* JSEG15 ne aveva due rispettivamente di

~40Kb e ~250Kb mentre *E. faecium* PSEG8 non possedeva alcun plasmide

(Figura 9; Tabella 10).



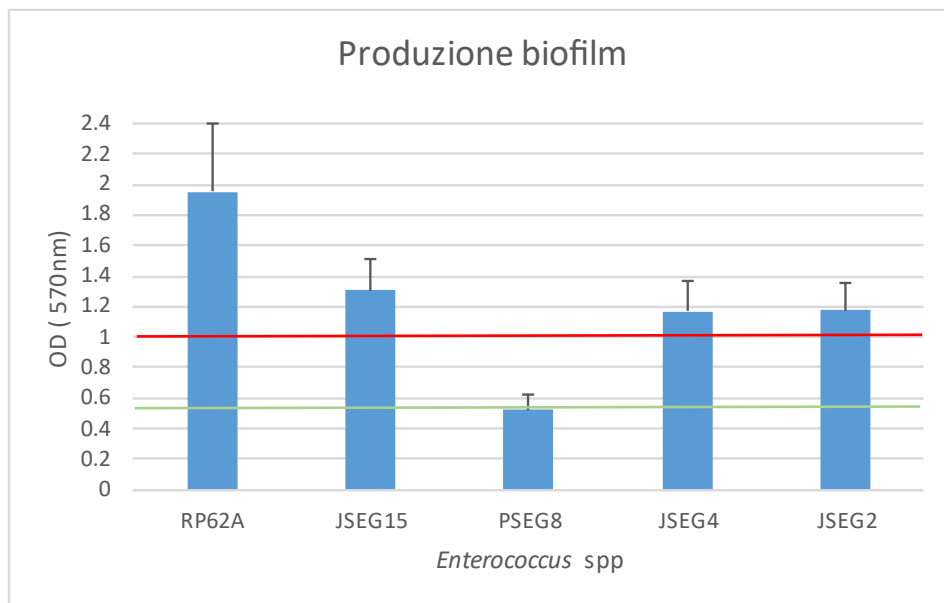
**Figura 9: S1-PFGE**

<b>Ceppi</b>	<b>Dimensioni plasmide</b>
<i>E. faecalis</i> JSEG2	~50 kb
<i>E. faecalis</i> JSEG4	~50 kb
<i>E. faecalis</i> PSEG8	/
<i>E. faecium</i> JSEG15	~40 kb ~250 kb

**Tabella 10: S1-PFGE**

## 4. Produzione di biofilm

Dato che uno dei fattori di virulenza degli enterococchi è la produzione di biofilm, è stata valutata la capacità di questi ceppi ambientali di produrlo. I risultati hanno messo in evidenza che i ceppi JSEG15, JSEG4 e JSEG2 sono forti produttori di biofilm, mentre PSEG8 è risultato essere un debole produttore. I risultati sono rappresentati nel **grafico 2**.



**Grafico 2:** valutazione della produzione di biofilm: la linea verde rappresenta il cut-off per i deboli produttori di biofilm (0,5), mentre la linea rossa indica il cut-off per i forti produttori di biofilm (1,1).

## **5. Sviluppo *in vitro* del fenotipo resistente alla vancomicina**

Per valutare la capacità dei VVE selezionati di ripristinare la resistenza alla vancomicina, i ceppi sono stati esposti gradualmente a concentrazioni crescenti di vancomicina seminandoli in piastre di BHI contenenti vancomicina.

Solamente *E. faecium* JSEG15 è stato in grado di revertare ad un fenotipo di resistenza alla vancomicina, mentre i ceppi *E. faecalis* JSEG2, JSEG4 e PSEG8 non riuscivano a crescere quando esposti a concentrazioni al di sopra di 0.25 µg/ml di vancomicina, pertanto, non sono stati considerati VVE perché non erano in grado di esprimere la resistenza malgrado la presenza del gene *vanA* e la pressione selettiva esercitata dalla vancomicina.

I revertenti di *E. faecium* JSEG15 selezionati ad ogni passaggio nelle piastre con concentrazioni crescenti di vancomicina sono stati quindi analizzati per il loro livello di resistenza mediante la determinazione della MIC.

I valori della MIC aumentavano all'aumentare della concentrazione di vancomicina a cui erano stati esposti. Già al primo passaggio (dopo



crescita in presenza di vancomicina 0,12 µg/ml) *E. faecium* JSEG15 presentava un valore di MIC di 32 µg/ml (**JSEGrev1**), che aumentava a 64 µg/ml e infine a 128 µg/ml dopo crescita del ceppo in presenza di 8 µg/ml di vancomicina (**JSEGrev2**) e di 16 µg/ml di vancomicina (**JSEGrev3**) rispettivamente. I risultati sono riassunti nella **Tabella 11**. Sono stati quindi selezionati e studiati i tre revertenti con i 3 diversi valori di MIC (evidenziati in giallo nella **Tabella 11**).

Ceppo	Concentrazione di vancomicina usata per la selezione dei revertenti (µg/ml)	MIC (µg/ml)
<i>E. faecium</i> JSEG15	0,12	32
	0,25	32
	0,5	32
	1	32
	2	32
	4	32
	8	64
	16	128
	32	128
	64	128

**Tabella 11:** determinazione della MIC dei revertenti

## 6. Stabilità del fenotipo di resistenza alla vancomicina

Abbiamo ulteriormente studiato la stabilità del fenotipo di resistenza alla vancomicina dei 3 revertenti selezionati in condizioni non selettive (senza antibiotici) per 10 giorni. Dopo i dieci passaggi in piastre di BHI senza antibiotico è stata valutata la sensibilità alla vancomicina attraverso la determinazione della MIC in agar.

Per i ceppi revertenti JSEG15rev2 e JSEG15rev3 il fenotipo di resistenza sembrava essere stabile poiché, nonostante alcune oscillazioni, al termine del 10° passaggio presentavano ancora livelli elevati di resistenza alla vancomicina con valori di MIC di 64 µg/ml.

Il revertente JSEG15rev1, invece, presentava un fenotipo di resistenza instabile perché dal 6° giorno di crescita in assenza di vancomicina mostrava un livello ridotto di resistenza alla vancomicina con valori di MIC di 8 µg/ml (**Tabella 12**).

Passaggi di reversione	MIC vancomicina µg/ml		
	JSEG15 rev1	JSEG15 rev2	JSEG15 rev3
<b>0</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>128</b>
1	16	128	8
2	16	64	16
3	16	64	8
4	16	64	32
5	16	64	64
6	8	64	64
7	8	64	8
8	8	64	64
9	8	64	32
10	8	64	64

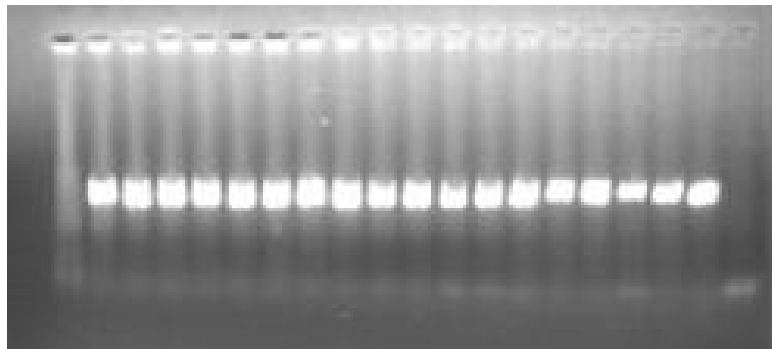
**Tabella 12:** determinazione della MIC in agar dei re-revertanti

I re-revertenti sono stati, inoltre, analizzati mediante saggi di PCR per valutare la presenza del gene *vanA*.

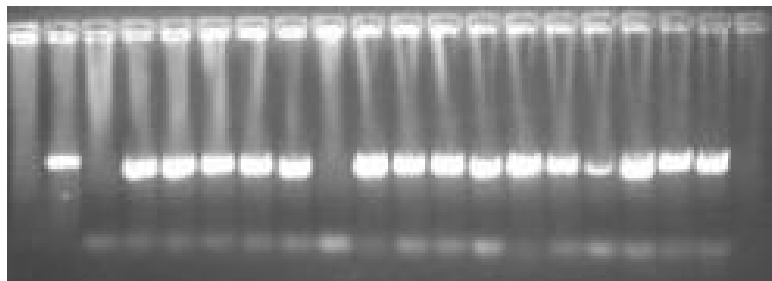
Tutti i re-revertenti, anche quelli di JSEG15rev1 che mostravano un fenotipo di resistenza instabile avevano mantenuto il gene *vanA*. Anche i revertenti di JSEG15rev2 (dopo 8 passaggi) e di JSEG15rev3 (dopo 5 passaggi), che nella Figura 12 sembravano negativi, presentavano il gene *vanA* ripetendo la PCR.

**Figura 10: PCR per il gene *vanA* sui re-revertenti**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



1° riga:

1. Marker 100bp
2. C+ JSEG15 *wt*
3. JSEG15rev1-1
4. JSEG15rev1-2
5. JSEG15rev1-3
6. JSEG15rev1-4
7. JSEG15rev1-5
8. JSEG15rev1-6
9. JSEG15rev1-7
10. JSEG15rev1-8
11. JSEG15rev1-9
12. JSEG15rev1-10
13. JSEG15rev2-1
14. JSEG15rev2-2
15. JSEG15rev2-3
16. JSEG15rev2-4
17. JSEG15rev2-5
18. JSEG15rev2-6
19. JSEG15rev2-7
20. H<sub>2</sub>O

2° riga:

1. Marker 100bp
2. C+ JSEG15 *wt*
3. JSEG15rev2-8
4. JSEG15rev2-9
5. JSEG15rev2-10
6. JSEG15rev3-1
7. JSEG15rev3-2
8. JSEG15rev3-3
9. JSEG15rev3-4
10. JSEG15rev3-5
11. JSEG15rev3-6
12. JSEG15rev3-7
13. JSEG15rev3-8
14. JSEG15rev3-9
15. JSEG15rev3-10
16. JSEG15rev1
17. JSEG15rev2
18. JSEG15rev2
19. JSEG15rev3
20. H<sub>2</sub>O

## 7. Induzione della resistenza alla vancomicina

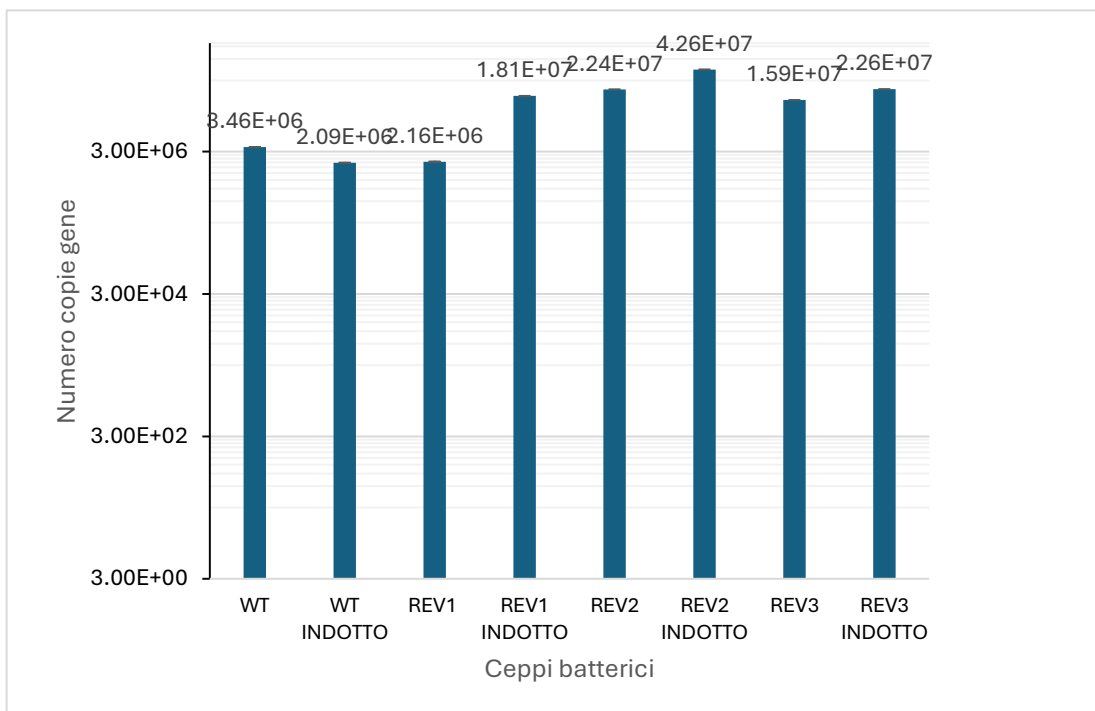
L'espressione costitutiva o inducibile della resistenza alla vancomicina è stata verificata tramite saggi di MIC con o senza induzione di vancomicina e tramite qPCR. Nel ceppo JSEG15*wt* la resistenza alla vancomicina sembra essere indotta da concentrazioni sub-inibenti dell'antibiotico, infatti la MIC dopo esposizione overnight a 0,5 µg/ml di vancomicina aumentava di 4 diluizioni rispetto al non indotto. Anche i revertenti, in particolare rev1 e rev3, esposti a 8 µg/ml di vancomicina mostravano una MIC maggiore di una diluizione mentre rev3 che già mostrava un alto livello di resistenza all'antibiotico non subiva variazioni. I risultati sono riassunti in *tabella 13*.

Ceppo	Vancomicina (µg/ml)	
	MIC	MIC post-induzione
JSEG15 <i>wt</i>	4	64
JSEG15 rev1	32	64
JSEG15 rev2	64	128
JSEG15 rev3	128	128

*Tabella 13: determinazione della MIC per valutare l'induzione*

## 8. Determinazione del numero di copie del gene *vanA*

Per valutare l'inducibilità della resistenza alla vancomicina è stato anche valutato il numero di copie del gene *vanA* tramite Real Time qPCR nel ceppo VVE JSEG15 e nei suoi revertenti, (JSEG15-rev1, -rev2 e -rev3) indotti e non indotti (**Grafico 3**).



**Grafico 3:** determinazione del numero di copie del gene *vanA*

Coerentemente ai risultati ottenuti a livello fenotipico tramite MIC, il numero di copie del gene *vanA* nei ceppi indotti è più alto rispetto ai non indotti e i revertenti hanno un numero maggiore di copie rispetto al *wild type*: questo dato potrebbe spiegare i valori di MIC più alti rispetto alla MIC del *wild type*.

## 9. Saggi di coniugazione

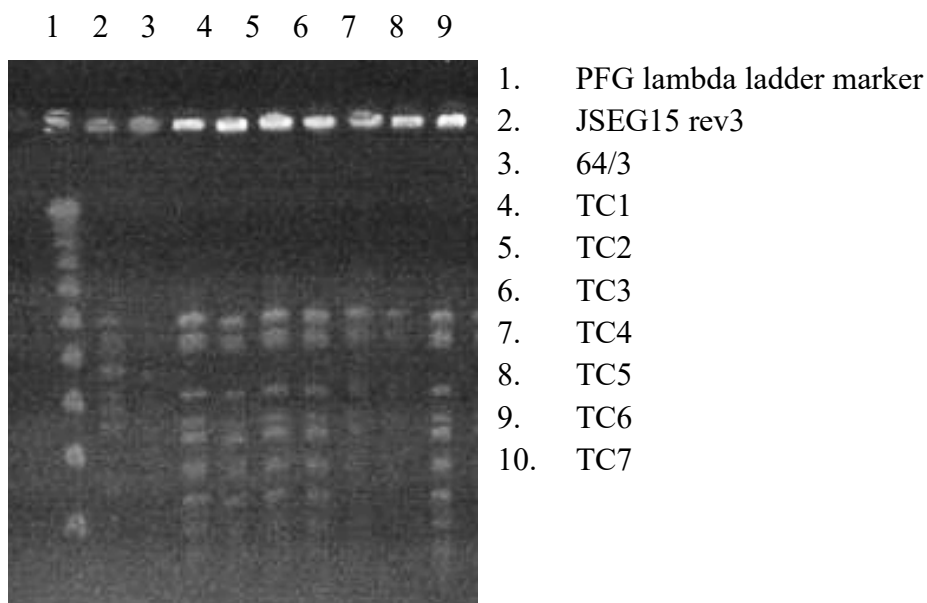
Gli esperimenti di coniugazione sono stati effettuati utilizzando come donatori i tre ceppi JSEG15-rev1, -rev2 e -rev3 e come ricevente il ceppo *E. faecium* 64/3. Sono stati ottenuti dei transconiuganti solamente utilizzando come donatore il ceppo JSEG15rev3. Considerando i valori di concentrazione del ricevente ( $\sim 7,77 \times 10^9$ ), la coniugazione è avvenuta con una frequenza di  $\sim 9 \times 10^{-9}$ . I risultati sono riportati nella **tabella 14**.

	Donatore			Ricevente			Transconiuganti	
	Conte	Media	D.S.	Conte	Media	D.S.	Conte	Freq. coniugazione
<i>E. faecium</i> JSEG15 rev1 X <i>E. faecium</i> 64/3	3,3x10 <sup>6</sup> 4,4x10 <sup>6</sup> 5,2x10 <sup>6</sup> 6,2x10 <sup>6</sup> 5,0x10 <sup>6</sup> 6,0x10 <sup>6</sup>	4,98x10 <sup>6</sup>	1,03x10 <sup>6</sup>	8,2x10 <sup>9</sup> 6,6x10 <sup>9</sup> 6,7x10 <sup>9</sup> 4,0x10 <sup>9</sup> 3,0x10 <sup>9</sup> 8,0x10 <sup>9</sup>	6,083x10 <sup>9</sup>	2,128x10 <sup>9</sup>	0	0
<i>E. faecium</i> JSEG15 rev2 X <i>E. faecium</i> 64/3	3,9x10 <sup>6</sup> 4,0x10 <sup>6</sup> 3,9x10 <sup>6</sup> 1,2x10 <sup>9</sup> 1,1x10 <sup>9</sup> 4,0x10 <sup>8</sup>	4,52x10 <sup>8</sup>	5,63x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>9</sup> 2,2x10 <sup>9</sup> 1,8x10 <sup>9</sup> 4,0x10 <sup>9</sup> 1,0x10 <sup>9</sup> 2,0x10 <sup>9</sup>	2,48x10 <sup>9</sup>	1,207x10 <sup>9</sup>	0	0
<i>E. faecium</i> JSEG15 rev3 X <i>E. faecium</i> 64/3	2,2x10 <sup>8</sup> 2,5x10 <sup>8</sup> 2,1x10 <sup>8</sup> 2,0x10 <sup>8</sup> 4,0x10 <sup>8</sup> 6,0x10 <sup>8</sup>	3,13x10 <sup>8</sup>	1,59x10 <sup>8</sup>	5,8x10 <sup>9</sup> 5,6x10 <sup>9</sup> 6,2x10 <sup>9</sup> 7,0x10 <sup>9</sup> 7,0x10 <sup>9</sup> 1,5x10 <sup>10</sup>	7,77x10 <sup>9</sup>	3,592x10 <sup>9</sup>	70	$\sim 9 \times 10^{-9}$

**Tabella 14:** coniugazione in vitro

I potenziali transconiuganti sono stati quindi analizzati attraverso la SmaI-PFGE per confermarne l'identità.

La SmaI-PFGE confermava che i ceppi selezionati erano transconiuganti, poiché mostravano un profilo di PFGE diverso da quello del donatore *E. faecium* JSEG15rev3 e simile a quello del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3 (**Figura 11**).



**Figura 11:** *SmaI* PFGE dei potenziali transconiuganti



## 10. Sequenziamento

Isolate	Resistance genes	Virulence factor
<i>E. faecium</i> JSEG15	<i>aac(6')-Ii, aac(6')-aph(2''), ant(6)-Ia, aph(3')-III, msr(C), erm(T), erm(B), cat, tet(M), tet(L), dfrG, vanA</i>	<i>acm, efaAfm</i>

**Tabella 15:** Geni di resistenza e fattori di virulenza identificati nel genoma di *E.*

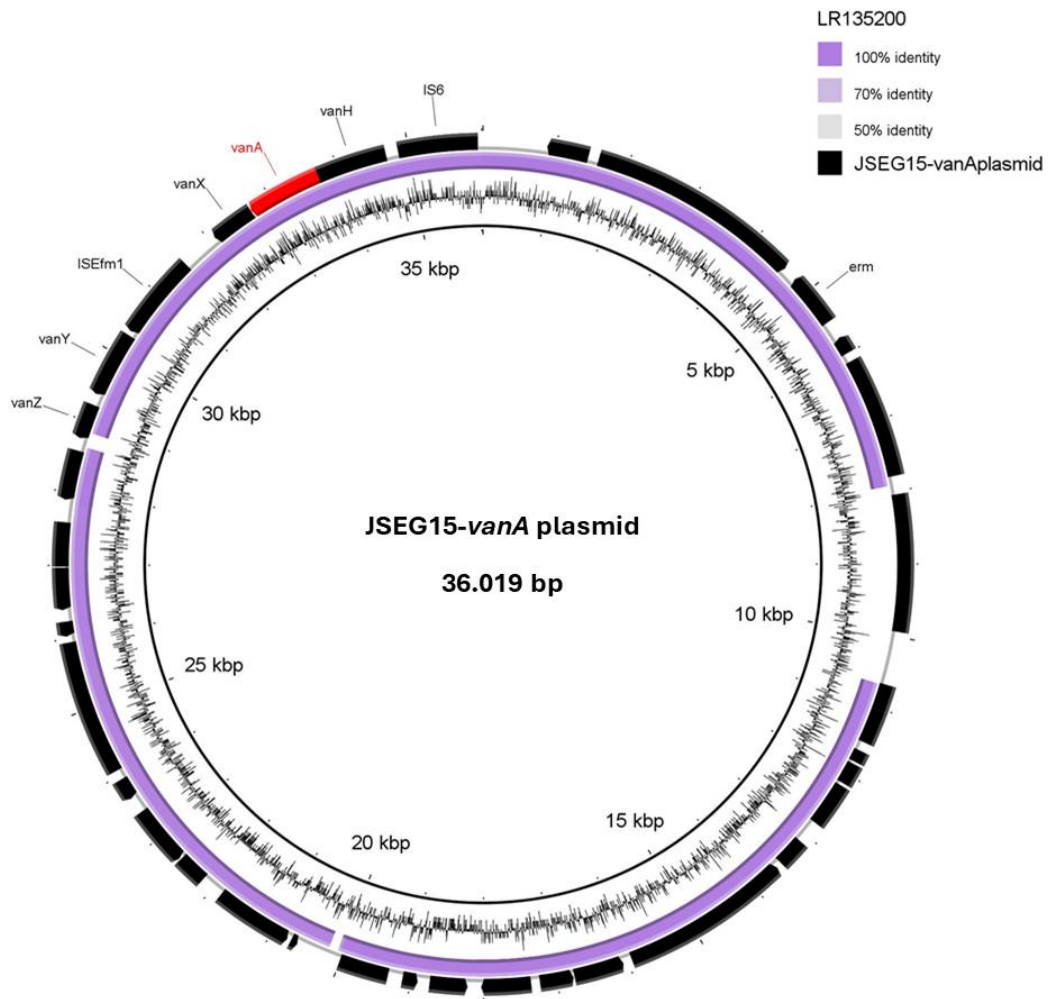
*faecium* JSEG15

Il sequenziamento dell'intero genoma di *E. faecium* JSEG15 mostrava la presenza nel ceppo di un cromosoma di 2,704,123 bp e di 2 plasmidi, uno di 36.019 bp e uno di 189.487 bp, nonché l'appartenenza al *sequence type* ST80.

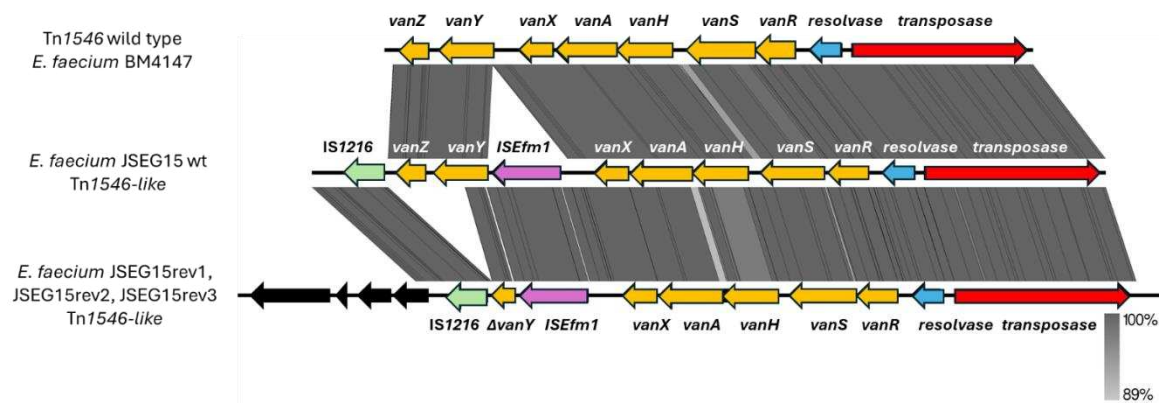
L'analisi del resistoma ha messo in evidenza la presenza di numerosi geni di resistenza e fattori di virulenza (**Tabella 15**).

Il gene *vanA* era contenuto all'interno del trasposone Tn1546-like localizzato sul plasmide di 36.019 bp. Dall'analisi BLAST, il plasmide mostrava 99,9% di identità e 91% coverage con il plasmide 4 di *Enterococcus faecium* E6055 di 41.060 bp (numero di accesso NZ\_LR135200.1) (Arredondo-Alonso et al., 2020) (**Figura 12**) che porta un Tn1546-like in cui il gene *vanZ* risulta troncato all'estremità 3'.

Rispetto al Tn1546 prototipo (numero d'accesso M97297.1) il Tn1546-like di *E. faecium* JSEG15 mostra 100% di identità e 98% coverage. In *E. faecium* JSEG15 è presente, a monte del *vanY*, una sequenza di inserzione (ISE*fm1*) e una delezione di 44 bp nella regione del promotore del cluster *vanHAX*. Il Tn1546-like nei 3 revertenti era identico e, rispetto al ceppo JSEG15, mostravano anch'essi la stessa delezione del promotore ma anche una delezione di 1283bp che comprendeva la porzione 3' del gene *vanY* (di 541bp), l'intero gene *vanZ* e una regione di 104 bp a valle di quest'ultimo (**Figura 13**).



**Figura 12:** Mappa circolare del plasmide-*vanA* di JSEG15 paragonato al plasmide 4 di *Enterococcus faecium* E6055 (numero di accesso NZ\_LR135200.1) utilizzando il software BRIG.



**Figura 13:** Mappa lineare del prototipo Tn1546 di *E. faecium* BM4147 (numero di accesso M97297.1) in confronto con i trasposoni Tn1546-like di *E. faecium* JSEG15 e dei suoi revertenti.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni, gli enterococchi si sono evoluti da microrganismi prevalentemente commensali diventando patogeni nosocomiali multiresistenti responsabili di una grande varietà di infezioni, fra cui endocarditi, setticemie e infezioni del tratto urinario (Sivertsen et al., 2016). All'interno del genere *Enterococcus* spp., *E. faecalis* ed *E. faecium* sono le specie che più frequentemente causano infezioni nell'uomo (Koch et al., 2004). Per il trattamento di queste infezioni l'antibiotico di prima scelta è la vancomicina, dato che molto spesso gli enterococchi sono resistenti ad altri antibiotici come la gentamicina e l'ampicillina (Sivertsen et al., 2016).

Negli anni '80 in Francia e nel Regno Unito sono stati isolati i primi ceppi di enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) che si sono poi diffusi in molti Paesi del mondo comportando degenze ospedaliere più lunghe e tassi di mortalità maggiori rispetto alle infezioni causate da ceppi sensibili (Szakacs et al., 2014). L'aumento della resistenza alla vancomicina solleva una serie di preoccupazioni poiché le opzioni terapeutiche disponibili per affrontare queste infezioni diventano fortemente limitate (Wagner et al., 2021).

Il principale elemento genetico responsabile della resistenza alla vancomicina negli enterococchi è il cluster genico *vanA* situato sul

trasposone Tn1546 (10,8 kb). Tale cluster comprende sette geni: *orf1* e *orf2* coinvolti nella trasposizione, *vanH*, *vanA*, *vanX* e *vanY* associati alla resistenza alla vancomicina e *vanZ* per la resistenza alla teicoplanina. I geni *vanR* e *vanS* codificano un sistema a due componenti che regola l'espressione del cluster in base alla presenza di glicopeptidi nell'ambiente. I geni *vanH*, *vanA* e *vanX* sono stati ritenuti fondamentali per lo sviluppo della resistenza alla vancomicina (Gagnon et al., 2011). Il trasposone Tn1546 può trovarsi su plasmidi o cromosomi e generalmente la sequenza è ben conservata. Tuttavia, può subire variazioni strutturali causate da inserzioni di elementi IS o delezioni che possono portare a modifiche del cluster *vanA* (Coccitto et al., 2024).

Nel 2011 è stata descritta per la prima volta una variante di enterococchi vancomicino-resistenti, ovvero degli isolati di *E. faecium* sensibili alla vancomicina ma portatori del gene *vanA*. Questi ceppi sono stati definiti enterococchi vancomicina-variabili (VVE) per la loro capacità di ripristinare un fenotipo resistente (Sivertsen et al., 2016). La distribuzione di questa variante fenotipica, tuttavia, non è ancora nota (Gagnon et al., 2011). La reversione dal fenotipo sensibile a resistente per i VVE generalmente si verifica sotto la pressione selettiva esercitata dalla vancomicina e ciò è stato dimostrato sia *in vivo* che *in vitro* (Coccitto et al., 2024; Thaker et al., 2015). Questo ha

delle ripercussioni cliniche significative poiché la sottopopolazione di VVE resistenti potrebbe emergere durante il trattamento con antibiotici causando fallimenti terapeutici (Wagner et al., 2023).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di esaminare la presenza di VVE in campioni di origine ambientale ed analizzarne le caratteristiche genotipiche e fenotipiche.

Innanzitutto, è stata ricercata la presenza del gene *vanA* in ceppi di *Enterococcus* spp. provenienti da campioni di sedimento, zooplancton e acqua.

Circa il 2% degli isolati (quattro su un totale di 156 ceppi analizzati) possedevano il gene *vanA* pur mostrando sensibilità alla vancomicina (JSEG2, JSEG4, JSEG15 e PSEG8) con valori di MIC compresi fra 1 e 4 µg/ml. Questi ceppi sono stati, pertanto, considerati potenziali VVE.

Dall'identificazione a livello di specie mediante PCR è emerso che 3 ceppi appartenevano alla specie *E. faecalis* (JSEG2, JSEG4, PSEG8) e un ceppo a *E. faecium* (PSEG8).

Le analisi di tipizzazione tramite SmaI-PFGE hanno rivelato la presenza di un clone che comprendeva i ceppi *E. faecalis* JSEG2 ed *E. faecalis* JSEG4 (pulsotipo A) mentre i ceppi *E. faecalis* PSEG8 (pulsotipo B) ed *E. faecium* JSEG15 (pulsotipo C) non erano geneticamente correlati. L'analisi con S1-

PFGE ha evidenziato la presenza di un unico plasmide di circa 50 kb nei ceppi *E. faecalis* JSEG2 e JSEG4, due plasmidi (uno da circa 40 kb e l'altro da circa 250 kb) in *E. faecium* JSEG15 e l'assenza di plasmidi in *E. faecalis* PSEG8.

Abbiamo poi valutato la capacità di questi quattro ceppi di revertare al fenotipo resistente inoculandoli in piastre di BHI contenenti concentrazioni crescenti di vancomicina. *E. faecium* JSEG15 è stato l'unico dei 4 potenziali VVE ad aver sviluppato una resistenza completa alla vancomicina, manifestando una MIC >128µg/ml. Per cui solo *E. faecium* JSEG15 è stato considerato un VVE tra tutti i ceppi ambientali analizzati nel nostro studio, rappresentando una bassa percentuale (1%), ma in linea con la bassa prevalenza di VVE anche in ambiente clinico (Coccitto et al., 2024).

*E. faecium* JSEG15 apparteneva al *sequence type* ST80 come molti dei ceppi di *E. faecium* (O'Toole et al., 2023). L'identificazione di questo *sequence type* nell'ambiente è rilevante in quanto potrebbe indicare una diffusione extraospedaliera di cloni epidemici provenienti da ambienti nosocomiali.

Negli esperimenti di induzione della resistenza alla vancomicina sono stati ottenuti tre revertanti con 3 diversi valori di MIC: JSEG15 rev1 avente valori di MIC pari a 32µg/ml, JSEG15 rev2 con MIC pari a 64 µg/ml e JSEG15 rev3 con MIC di 128µg/ml.



Abbiamo quindi analizzato la stabilità del fenotipo di resistenza alla vancomicina dei 3 revertenti inoculandoli in piastre di BHI prive di antibiotico per 10 giorni. Abbiamo notato che per i ceppi revertenti *E. faecium* JSEG15 rev2 e JSEG15 rev 3 il fenotipo di resistenza sembrava stabile perché dopo 10 giorni avevano mantenuto livelli ancora elevati di resistenza alla vancomicina (MIC di 64µg/ml). JSEG15 rev 3, invece, ha mostrato un calo significativo del valore di MIC, sceso fino a 8 µg/ml al sesto giorno, nonostante fosse mantenuto il gene *vanA*, indicando un fenotipo di resistenza instabile. Questi risultati non sono completamente in linea con quanto sostenuto da Wagner et al., 2023 che suggerisce che la reversione alla resistenza alla vancomicina sia generalmente associata a un costo elevato in termini di fitness, e che tale costo possa essere ridotto o annullato in assenza della pressione selettiva esercitata dall'antibiotico.

Il sequenziamento dell'intero genoma di *E. faecium* JSEG15 ha rivelato la presenza del gene *vanA* all'interno di un plasmide di 36,019bp, contenuto in un trasposone Tn1546-like. Ciò è coerente con la letteratura, che riporta frequentemente la presenza del gene *vanA* in questo trasposone (Szakacs et al., 2014; Gagnon et al., 2011).

Per cercare di capire le basi genetiche della sensibilità alla vancomicina la sequenza nucleotidica del trasposone Tn1546-like è stata studiata in maniera

approfondita e confrontata con il prototipo Tn1546 (GenBank accession no. M97297). Abbiamo osservato che il Tn1546-like di *E. faecium* JSEG15 e il Tn1546 differiscono per l'inserzione di una sequenza IS (*ISEfm1*) a monte del gene *vanY* e per una delezione di 44 bp nella regione del promotore del cluster *vanHAX*. Una delezione delle stesse dimensioni e pressoché nello stesso sito del promotore, è stata descritta sia in un ceppo clinico isolato nel nostro ospedale (Coccitto et al., 2024) che in letteratura (Wagner et al., 2021). Il Tn1546-like era identico nei 3 revertenti e rispetto al ceppo JSEG15 mostravano anch'essi la stessa delezione del promotore ma anche una delezione della porzione 3' del gene *vanY* (di 541bp), dell'intero gene *vanZ* e di una regione di 104bp a valle di quest'ultimo. L'assenza di *vanZ* è stata riscontrata anche in altri studi ma questo gene non è considerato necessario per un fenotipo resistente (Wagner et al., 2023). La delezione di 44 bp non interessava tuttavia le sequenze consenso riconosciute dall'RNA polimerasi, quindi la trascrizione del cluster *vanHAX* non sembrava compromessa. La prova che il promotore era ancora funzionale è derivata infatti dall'acquisizione del fenotipo resistente in seguito ad esposizione alla vancomicina da parte sia del ceppo VVE che dei suoi revertenti.

In base a questi risultati abbiamo cercato di capire se la reversione al fenotipo resistente fosse dovuta solo ad un numero maggiore di copie o ad una maggiore espressione del gene di resistenza *vanA*.

La resistenza fenotipica alla vancomicina sembra essere indotta da concentrazioni sub-inibenti di antibiotico, sia nel ceppo *wild type* che nei tre revertenti. La MIC dei ceppi sottoposti ad induzione è aumentata da 1 a 3 volte. Questo è in accordo con quanto riportato da Wagner et al., 2021 che ha osservato un aumento significativo dell'espressione dei geni di resistenza in risposta all'esposizione alla vancomicina. Wagner et al., 2021 conferma che l'operone *van* rappresenta un esempio tipico di resistenza inducibile ai glicopeptidi e che vi è anche un'espressione costitutiva a basso livello dell'operone in assenza dell'induzione da parte della vancomicina.

Tramite Real Time qPCR abbiamo quantificato il numero di copie del gene *vanA* nei ceppi indotti e non indotti. Come previsto dai valori di MIC precedentemente ottenuti, abbiamo osservato che il numero di copie del gene nei ceppi indotti era maggiore rispetto a quelli non indotti. Inoltre, i ceppi revertenti presentavano un numero più alto di copie rispetto al *wild type*. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Wagner et al., 2021, Wagner et al., 2023, Coccitto et al., 2024 che hanno riscontrato un numero maggiore di copie dell'operone nei ceppi VVE resistenti rispetto a quelle trovate nei *wild*

*type* sensibili. Per cui la trascrizione di un più elevato numero di copie del plasmide contenente il gene *vanA* potrebbe aver contribuito al ripristino del fenotipo resistente alla vancomicina nei revertenti (Wagner et al., 2021).

È stato poi effettuato un esperimento di coniugazione *in vitro* per verificare se la resistenza alla vancomicina fosse trasferibile. Sono stati ottenuti dei transconiuganti solo usando il ceppo *E. faecium* JSEG15 rev 3 come donatore, con una frequenza di  $\sim 9 \times 10^{-9}$ . Per gli altri due ceppi invece non sono state riscontrate frequenze rilevabili in condizioni di laboratorio. Abbiamo così confermato quanto riportato da diversi autori, tra cui Wagner et al., 2021 che sostiene che in alcuni ceppi di VVE il cluster genico *vanA* possa essere situato su un plasmide coniugativo, consentendo la diffusione della resistenza alla vancomicina ad altri batteri.

Dallo studio sulla produzione di biofilm è emerso che *E. faecalis* JSEG2, *E. faecalis* JSEG4 e *E. faecium* JSEG15 sono forti produttori di biofilm, mentre *E. faecalis* PSEG8 è un debole produttore. Gli enterococchi sono noti per la loro capacità di produrre biofilm ed *E. faecalis* lo fa più frequentemente rispetto a *E. faecium* (Hashem et al., 2017).

Alla luce dei risultati ottenuti, in questo studio abbiamo rilevato la presenza di un unico ceppo di *E. faecium* VVE da campioni ambientali. Alla base della reversione al fenotipo resistente probabilmente c'è un aumento del numero di copie del gene *vanA*. Abbiamo, inoltre, dimostrato la trasferibilità del plasmide su cui è localizzato il gene di resistenza *vanA*, il che è preoccupante perché indica un potenziale rischio di diffusione dei VVE nell'ambiente oltre che in ambito nosocomiale.

L'analisi genotipica dei ceppi ambientali è fondamentale per comprendere la loro diversità genetica. La presenza degli enterococchi vancomicina-variabili in ambito clinico, come in quello ambientale, è sicuramente sotto-notificata visto che, ad oggi, l'identificazione degli enterococchi resistenti alla vancomicina si basa su caratteristiche fenotipiche.

L'abuso di antibiotici nell'ambiente rappresenta un ulteriore fattore di rischio che può favorire l'emergere dei ceppi resistenti come i VVE. In conclusione, la sorveglianza e la comprensione accurata dei VVE, dei meccanismi di reversione e della loro ecologia è importante per cercare di contenere la loro diffusione oltre che nei contesti clinici anche in quelli ambientali dai quali questi batteri possono tornare all'uomo attraverso la balneazione, l'acquacoltura e il consumo di frutti di mare.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M. O., & Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance*, 24(5), 590–606. <https://doi.org/10.1089/MDR.2017.0147/ASSET/IMAGES/MEDIUM/INLINE1.TIF.GIF>
- Arredondo-Alonso, S., Top, J., McNally, A., Puranen, S., Pesonen, M., Pensar, J., Marttinen, P., Braat, J. C., Rogers, M. R. C., van Schaik, W., Kaski, S., Willems, R. J. L., Corander, J., & Schürch, A. C. (2020). Plasmids Shaped the Recent Emergence of the Major Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecium*. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.03284-19>
- Barathe, P., Kaur, K., Reddy, S., Shriram, V., & Kumar, V. (2024). Antibiotic pollution and associated antimicrobial resistance in the environment. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 5, 100105. <https://doi.org/10.1016/J.HAZL.2024.100105>
- Buelow, E., Ploy, M. C., & Dagot, C. (2021). Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 117–124. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2021.10.005>
- Butler, K. M. (2006). Enterococcal Infection in Children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 17(3), 128–139. <https://doi.org/10.1053/J.SPID.2006.06.006>
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 76(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Coccitto, S. N., Cinthi, M., Simoni, S., Pocognoli, A., Zeni, G., Mazzariol, A., Morroni, G., Mingoia, M., Giovanetti, E., Brenciani, A., & Vignaroli, C. (2024). Genetic analysis of vancomycin-variable *Enterococcus faecium* clinical isolates in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 43(4), 673–682. <https://doi.org/10.1007/S10096-024-04768-0>

- Courvalin, P. (2008a). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 264(1), 4–16.  
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2008.01940.X>
- Courvalin, P. (2008b). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 264(1), 4–16.  
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2008.01940.X>
- Ferchichi, M., Sebei, K., Boukerb, A. M., Karray-Bouraoui, N., Chevalier, S., Feuilleley, M. G. J., Connil, N., & Zommiti, M. (2021). Enterococcus spp.: Is It a Bad Choice for a Good Use—A Conundrum to Solve? *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9112222>
- Fiore, E., Tyne, D. Van, & Gilmore, M. S. (2019). *Pathogenicity of Enterococci*.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
- Gagnon, S., Lévesque, S., Lefebvre, B., Bourgault, A. M., Labbé, A. C., & Roger, M. (2011). vanA-containing Enterococcus faecium susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletions in Tn1546. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2758–2762.  
<https://doi.org/10.1093/JAC/DKR379>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019a). *The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019b). *The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Hashem, Y. A., Amin, H. M., Essam, T. M., Yassin, A. S., & Aziz, R. K. (2017). Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports*, 7(1).  
<https://doi.org/10.1038/S41598-017-05901-0>
- Hooper, D. C. (n.d.). *Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones*. Retrieved September 9, 2024, from [https://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement\\_2/S24/483673](https://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement_2/S24/483673)
- Jospe-Kaufman, M., Siomin, L., & Fridman, M. (2020). The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(13), 127218.  
<https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2020.127218>

- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., & Huebner, J. (2004a). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22(7), 822–830. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2003.11.027>
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., & Huebner, J. (2004b). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22(7), 822–830. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2003.11.027>
- Kohler, P., Eshaghi, A., Kim, H. C., Plevneshi, A., Green, K., Willey, B. M., McGeer, A., & Patel, S. N. (2018). Prevalence of vancomycin-variable *Enterococcus faecium* (VVE) among vanA-positive sterile site isolates and patient factors associated with VVE bacteremia. *PloS One*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0193926>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* 2021 20:5, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2014.02.001>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 481–511. <https://doi.org/10.1128/9781555819286.CH17>
- O'Toole, R. F., Leong, K. W. C., Cumming, V., & Van Hal, S. J. (2023). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. *Research in Microbiology*, 174(4). <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2023.104046>
- Sivertsen, A., Pedersen, T., Larssen, K. W., Bergh, K., Rønning, T. G., Radtke, A., & Hegstad, K. (2016). A Silenced vanA Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4119. <https://doi.org/10.1128/AAC.00286-16>
- Szakacs, T. A., Kalan, L., McConnell, M. J., Eshaghi, A., Shahinas, D., McGeer, A., Wright, G. D., Low, D. E., & Patel, S. N. (2014). Outbreak of vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* containing the wild-type vanA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1682–1686. <https://doi.org/10.1128/JCM.03563-13>



- Thaker, M. N., Kalan, L., Waglechner, N., Eshaghi, A., Patel, S. N., Poutanen, S., Willey, B., Coburn, B., McGeer, A., Low, D. E., & Wright, G. D. (2015). Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1405–1410. <https://doi.org/10.1128/AAC.04490-14>
- Wagner, T. M., Janice, J., Schulz, M., Ballard, S. A., da Silva, A. G., Coombs, G. W., Daley, D. A., Pang, S., Mowlaboccus, S., Stinear, T., Hegstad, K., Howden, B. P., & Sundsfjord, A. (2023). Reversible vancomycin susceptibility within emerging ST1421 *Enterococcus faecium* strains is associated with rearranged vanA-gene clusters and increased vanA plasmid copy number. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 62(1). <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2023.106849>
- Wagner, T. M., Janice, J., Sivertsen, A., Sjögren, I., Sundsfjord, A., & Hegstad, K. (2021). Alternative vanHAX promoters and increased vanA-plasmid copy number resurrect silenced glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(4), 876–882. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA541>