

Co-diversificazione del genoma << core >> di *Enterococcus faecium* e PBP5: Evidenze di processi di trasferimento genetico orizzontale

La resistenza all'ampicillina ha di certo contribuito al recente aumento di un cluster di linee umane di *Enterococcus faecium* (ST17, ST18 e ST78) adattate alle infezioni nosocomiali.

Cambiamenti nel gene cromosomico *pbp5* hanno portato alla formazione di diverse varianti (denominate *pbp5*-C type) associate ai diversi livelli di sensibilità all'ampicillina. Lo studio qui descritto, condotto su 78 ceppi di *E. faecium* ha evidenziato che la diversità dei geni *pbp5* rispecchia la diversificazione filogenetica del microrganismo e che la presenza di identici *pbp5* C-types in lignaggi di diversa origine geografica e ambientale testimoniano un fenomeno di trasferimento genetico orizzontale, tra le diverse popolazioni di *E. faecium*. Ciò è stato supportato da saggi sperimentali che mostrano il trasferimento genetico di grandi porzioni genetiche (180-280 Kb circa) contenenti alleli del gene *pbp5*, Pon A (transglicosilasi) e *PbpF*, e altri geni coinvolti in pathway metabolici e di adattamento.

Infine, l'analisi del profilo di mutazione di *pbp5* in genomi e ceppi disponibili da questo studio suggerisce che la diffusione di alcune *pbp5* C-types potrebbe essersi verificata anche in assenza di un fenotipo di resistenza all'ampicillina e che l'arsenale dei caratteri adattativi situati nella regione cromosomica contenente *pbp5* ha contribuito al coinvolgimento del gene nell'adattamento di *E. faecium* al tratto gastro intestinale dei mammiferi.

Introduzione

I primi degli anni ottanta hanno visto un incremento esponenziale di infezioni dovute al batterio *Enterococcus faecium*, così come dei casi di resistenza agli antibiotici (Top at al., 2007).

Attualmente, la maggior parte dei ceppi clinici di *E. faecium* sono ampicillino resistenti (AmpR) e spesso acquisiscono anche elementi genetici mobili trasferibili, alcuni dei quali codificano per la resistenza alla vancomicina (Arias and Murray, 2012; Wagenvoort et al., 2015).

Enterococcus faecium è tipicamente resistente alle cefalosporine mentre presenta invece una ridotta sensibilità naturale alle penicilline. E' dotato inoltre di 6 proteine leganti la penicillina (PBPs) appartenenti alla classe B (monofunctional D,D- transpeptidase), o alla classe A (bifunctional enzymes with glicosyltransferase and D,D-transpeptidase activity), alcune delle quali sono associate alla resistenza ai β -lattamici (Zorzi et al., 1996; Rise et al., 2009). In *E. faecium* la resistenza agli antibiotici β -lattamici è conferita dalle PBP5 di classe B (a bassa affinità) con la partecipazione delle PBPs di classe A (PonA, *pbpF*) per la sintesi della parete in presenza di cefalosporine (Williamson et al., 1983; Rise et al., 2009). Inizialmente si è creduto che la maggiore produzione di PBP5 e/o dei polimorfismi nelle subunità beta di questa proteina fossero le cause della resistenza alle alte concentrazioni di ampicillina in *E. faecium* (Fontana et al., 1996). Successivamente invece,

si è potuto accertare che tali cambiamenti erano spesso specifici del ceppo e non erano necessariamente correlate con le differenze nei valori di MIC di ampicillina (Fontana et al., 1996; Zorzi et al., 1996; Rybkine et al., 1998; Rice et al., 2001, 2004; Sifaoui et al., 2001; Belhaj et al., 20016) . Ulteriori analisi su ceppi di *E. faecium* caratterizzati da diversi livelli di sensibilità all'ampicillina hanno portato a scoprire che la variabilità delle sequenze PBP5 è dovuta fondamentalmente a cambiamenti in 21 specifiche posizioni della proteina, indicando quindi che mutazioni sequenziali potrebbero aver determinato la progressiva resistenza all'ampicillina a partire dai primi anni 80 (Galloway-Pena et al., 2011; Pietta et al., 2014).

La biologia di popolazione di *Enterococcus faecium* è dominata da due gruppi filogenomici principali, il clade A e il clade B. La maggior parte degli isolati AmpR appartenenti al clade A comprende *E. faecium* da pazienti ospedalizzati (Galloway-Pena et al., 2012; Palmer et al., 2012; Lebreton et al., 2013). Un sottogruppo all'interno del clade A è il clade A1, caratterizzato dalla presenza di elementi genetici mobili e spiccate capacità di colonizzare e persistere negli ospiti umani grazie alla presenza di adesine e tratti metabolici specifici. Il clade B invece, contiene principalmente ceppi (AmpS) isolati da individui non ospedalizzati (Willems et al., 2005; Lebreton et al., 2013; Tedim et al., 2015; Freitan et al., 2016; Guzman Prieto et al., 2016). La crescente presenza di isolati AmpR tra gli individui non ospedalizzati è preoccupante, poiché l'acquisizione di geni trasferibili codificanti per la resistenza all'ampicillina potrebbe facilitare la sua ulteriore diffusione nei ceppi di AmpS di *E. faecium* di altre specie di enterococchi per i quali la resistenza all'ampicillina è stata finora raramente documentata.

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Sono state condotte analisi su settantotto isolati da una raccolta di 205 *E. faecium* AmpR (MIC \geq 16mg/L) isolati in Portogallo negli ultimi decenni (Novais et al., 2005a,b,c, 2006, 2013). La selezione è stata condotta in maniera tale da includere isolati con diversi fenotipi di resistenza agli antibiotici, e, differente provenienza (39 provenienti da pazienti ospedalizzati di diversi paesi, 18 da feci suine, 4 da carcasse di pollame, 2 da feci di umani sani e 15 da acque reflue). È stata quindi valutata la suscettibilità all'ampicillina e ad altri dieci antibiotici mediante la tecnica diffusione in agar da dischetto. La produzione di β -lattamasi è stata testata in isolati AmpR *E. faecium* mediante il test della nitrocefina e l'amplificazione con PCR del *blaZ* utilizzando *primers* basati sulla sequenza GenBank no. M25257.1. La correlazione clonale è stata stabilita mediante tecniche di elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE) e Multilocus Sequence Typing (MLST) (tenover et al., 2002; Fretas et al., 2013) utilizzando l'algoritmo di analisi Bayesiana della Struttura di Popolazione

(BAPS) (Willems et al., 2012; Tedim et al., 2015).

Trasferibilità dell'ampicillina resistenza

Saggi di coniugazione su filtro sono state eseguiti in terreno cerebrale Brain Heart Infusion (BHI) privo di antibiotici a 37°C utilizzando un rapporto donatore/ricevente 1:1 ed *E. faecium* GE1 come ricevente. Gli isolati risultanti in grado di trasferire il gene *pbp5* a *E. faecium* GE1 sono stati utilizzati come donatori in altri saggi e coniugazione su filtro utilizzando come riceventi i ceppi *E. faecium* BM4105RF ed *E. faecium* 64/3. I tre ceppi riceventi di laboratorio utilizzati erano differenti per la suscettibilità all'ampicillina e la presenza di *pbp5*. I transconiuganti sono stati selezionati su agar BHI addizionato di antibiotici e incubati per 24-96 ore al fine di recuperare i transconiuganti che crescono a tempi differenti. I transconiuganti sono stati confermati dal confronto tra il fenotipo di resistenza agli antibiotici e il profilo PFGE con quello dei donatore e ricevente. La stabilità delle regioni cromosomiche *pbp5* acquisite è stata valutata sia nei ceppi donatori che nei transconiuganti mediante passaggi giornalieri su agar BHI senza antibiotici.

Caratterizzazione della regione che conferisce AmpR

Mediante l'impiego del kit genomico batterico PureElute™ che fornisce un rapido isolamento del DNA genomico batterico Gram si è estratto il DNA totale di un ceppo donatore (AmpR *E. faecium* isolato clinico HPH2), di un ceppo ricevente (AmpS *E. faecium* GE1) e del risultante transconiugante GE1 (AmpR *E. faecium* TCGEHPH2.1). La concentrazione di Dna è stata valutata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro Nanodrop 2000 e del fluorimetro Qubit 2.0.

Successivamente il DNA genomico è stato sequenziato mediante il Sistema MiSeq di Illumina.

L'assemblaggio dei dati di sequenza è stato fatto servendosi del software Newbler. La previsione genica è stata eseguita utilizzando il programma GeneMark.hmm 3.05 (Besemer et al., 2001).

Ricerche di similarità per potenziali regioni codificanti proteine sono state eseguite su database UniRef100 usando l'approccio Best Blast Hit. La sequenza della regione trasferita contenente il gene *pbp5* è stata ricavata da una strategia di confronto gene-per-gene (geni presenti nel ceppo transconiugante TCGEHPH2.1 e ceppo donatore HPH2 ma non nel ceppo ricevente GE1) usando *blastn*. La regione trasferita è stata successivamente mappata contro il genoma del ceppo *E. faecium* DO utilizzando il software Easyfig 1.2. Oltre a *E. faecium* DO, la regione trasferita è stata anche allineata con genomi completamente sequenziati di vari ceppi di *E. faecium* (Darling et al., 2004).

ANALISI DEL CONTESTO GENETICO DI *PBP5*

Un frammento di DNA di grandezza compresa tra gli 8-10 Kb contenente il gene *pbp5* e le sue regioni confinanti è stato sottoposto a saggi di PCR in 15 transconiuganti e 21 neo-isolati di campo. Gli ampliconi sono stati discriminati confrontando i corrispondenti pattern RLFP ottenuti dopo la digestione con *DdeI* o *ApaI* e sequenze. La localizzazione genomica di *pbp5* è stata identificata mediante ibridazione di DNA genomico digerito con *I-CeuI* e *SmaI* con sonde 23 rDNAe/o *pbp5* (Liu et al., 1993; Fretas et al., 2013). La presenza di Ctn916, Ctn5386 e Ctn5382, associati alla trasferibilità della resistenza all'ampicillina è stata determinata analizzando la presenza di sequenze specifiche (Carias et al., 1998; Leòn-Sampedro et al., 2016). Le regioni genetiche trasferite da 8-10 kb portatrici di *pbp5* sono poi state comparate con i genomi di *E. faecium* disponibili nel database NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Analisi filogenetica di *PBP5*

Grazie all'utilizzo di BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) strumento di base per l'allineamento locale che si avvale dell'utilizzo di un algoritmo (Altschul et al., 1997) e al programma ClustalW2 per l'allineamento di sequenziamento multiplo (Larkin et al., 2007; Goujon et al., 2010) è stato possibile condurre un'analisi comparativa tra le sequenze di tutte le *pbp5* presenti nel database GenBank con quelle identificate in questo studio. Gli allineamenti di sequenze multiple sono stati condotti con l'ausilio del software Mega7 e la topologia dell'albero filogenetico è stata dedotta dall'algoritmo di massima somiglianza utilizzando PhyML (Guidon et al., 2010). La congruenza filogenomica dei genomi “core” delle sequenze *pbp5* sono state stabilite mediante analisi comparativa delle loro topologie a livello dell' albero genico. I Genomi di “core” dei ceppi di *E. faecium*, le cui bozze erano disponibili presso i database del NCBI sono state ricostruite utilizzando BLAST. Le sequenze cromosomiche sono state poi nuovamente annotate con GeneMarkS v2.8 (Basemer et al., 2001). Tutti i geni del genoma “core” sono stati concatenati e allineati usando MAFFT (Katoh and Toh, 2010). L'albero filogenetico è stato costruito mediante programma FastTree2 (Prise et al., 2010). Infine, il confronto tra alberi è stato effettuato tramite APE (analisi filogenetica ed evoluzione) utilizzando il software R (Paradis et al., 2004).

RISULTATI

Trasferibilità di AmpR (*pbp5*)

Dodici isolati sono stati in grado di trasferire una piattaforma genetica cromosomica contenente

pbp5 (associata ad AmpR) al ceppo *E. faecium* GE1. Cinque di loro sono stati anche in grado di trasferire *pbp5* a *E. faecium* BM4105RF e due a *E. faecium* 64/3. Tutti i ceppi donatori appartenevano ai principali lignaggi umani di *E. faecium* ed erano riconducibili a isolati clinici nosocomiali appartenenti ai sottogruppi BAPS 3.3 (ST670,ST132,ST280),3.1 (ST280,ST125) e 3.1a (ST393). La produzione di β -lattamasi non è stata rilevata in nessuno degli isolati. Tutti i transconiuganti erano caratterizzati da profili di PFGE simili a quelli dei ceppi riceventi, erano resistenti a rifampicina e acido fusidico e presentavano suscettibilità variabile all'ampicillina. Oltre al fenotipo AmpR, alcuni transconiuganti erano resistenti anche a vancomicina (n = 8), eritromicina (n = 6), tetraciclina (n = 1), streptomycin (n = 1) e/o gentamicina (n=1).

Il gene *pbp5* degli isolati AmpR si trova su regioni cromosomiche di grandi dimensioni e trasferibili contenenti anche geni metabolici

L'ibridazione di *pbp5* e delle sonde rDNA e 23S con la banda di DNA *CeuI* di alto pm ha permesso di rilevare una localizzazione cromosomica di *pbp5*. Una successiva ibridazione del DNA genomico digerito con *SmaI* con sonda *pbp5* ha evidenziato invece un'ibridazione con frammenti di 210 kb in tutti i transconiuganti GE1 tranne uno, per il quale la sonda *pbp5* si ibridava su una banda di 180 Kb. L'ibridazione della stessa sonda con frammenti di DNA genomico digerito di *SmaI* nei transconiuganti *E. faecium* BM4105RF ed *E. faecium* 64/3 di diverse dimensioni riflette eventi di trasferimento indipendente. La similarità tra i pattern PFGE dei transconiuganti ottenuti da diversi donatori ci fa capire che l'acquisizione del DNA avviene all'interno di una particolare regione del genoma. I ceppi donatori sono privi di integrasi/escissionasi di trasposoni di tipo coniugativo Tn916 (Tn916, Tn5386, Tn5382).

Per l'analisi della sequenza genomica sono stati analizzati la coppia donatore-ricevente e transconiugante. Il donatore era il ceppo clinico HPH2; il ricevente, *E. faecium* GE1 (inizialmente non possedeva *pbp5*, limitando in questo modo eventi di ricombinazione tra la piattaforma genetica di *pbp5* acquisita e quella già presente nel ceppo ricevente); e la dimensione del frammento di DNA digerito con *SmaI* che si ibridava con la sonda *pbp5* (210 kb). Il sequenziamento del ricevente (*E. faecium* GE1), donatore (*E. faecium* HPH2) e transconiugante (*E. faecium* TCGEHPH2.1) ha permesso l'identificazione di 7 contigs contenenti geni presenti sia nel donatore che nel transconiugante, ma assenti nel ceppo ricevente. I frammenti del gene *pbp5*, rappresentano una piattaforma genica di circa 280 Kb, leggermente più grande di quella dedotta dai frammenti *SmaI*-PFGE. Un'ulteriore analisi dei contigs ha portato successivamente a scoprire che due di essi contenevano geni presenti nel ricevente e nel transconiugante ma che erano invece assenti nel ceppo

donatore, facendo in questo modo pensare ad un trasferimento parziale di *pbp5* o ad eventi di ricombinazione post-trasferimento. L'analisi comparativa dei genomi sequenziati in questo lavoro con i 4 genomi completi di *E.faecium* presenti nel database NCBI hanno evidenziato una regione di 153 Kb comune in ceppi donatori/transconiuganti e i 4 genomi depositati, assenti nel genoma di *E.faecium* GEI (ricevente) mentre la rimanente sequenza della regione cromosomica trasferita di 280 kb era variabilmente presente e localizzata nei diversi genomi.

La piattaforma genetica trasferita da 280 Kb oltre a codificare per la resistenza ai β -lattamici (*pbp5*) conteneva geni in grado di svolgere svariate funzioni quali il trasporto di aminoacidi e carboidrati, processi redox, sopravvivenza alle condizioni di stress nell'ambiente intestinale e anche altri geni correlati alla resistenza ai β -lattamici. Da annoverare in quest'ultima categoria il gene *ponA*, codificante una PBP di classe A bifunzionale con attività transpeptidasi e transglicosilasi, coinvolta nella sintesi del peptidoglicano, che consente la sopravvivenza in presenza di inibitori della parete cellulare (Rice et al., 2009). Una copia dell'operone *CiaRH* che codifica per il sistema di trasduzione del segnale a due componenti che risponde alla risposta di stress lisogeno cellulare e limitato a *Streptococcus* spp. La regione di 280 kb contenente la *pbp5* era caratterizzata anche dalla presenza di geni coinvolti nelle interazioni tra microrganismo - ospite che includevano tre sistemi di fosfotrasferasi (PTS, ovvero glucitolo/sorbitolo, L-ascorbato e mannosio/fruttosio/sorbosio), il sistema di trasporto e trasformazione ABC delle maltodestrine (*mal ACDX*) e l'epimerasi N-acetilmanosammina-6-fosfato. Altri geni metabolici erano quelli coinvolti nella tolleranza all'ambiente dell'acido intestinale, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, la subunità α ATP sintasi, la NADH deidrogenasi, la glutammina e geni codificanti enzimi coinvolti nella produzione di ammoniaca. Sono state identificate anche cinque proteine di risposta allo stress, due delle quali (*CspA* e *CspC*) appartenenti al sistema Csp (cold shock proteins) e il piccolo chaperone *Hsp20*, *Gls33* coinvolti nelle risposte allo stress osmotico, al pH ed all'esposizione dell'etanolo nel *Clostridium*. *Hsp20* è invece una proteina chaperone che garantisce la sopravvivenza in svariate condizioni di stress abiotico tra cui il calore ed il sale in *Bifidobacterium longum* (Khaskheli et al., 2015). Solo due ceppi (*Ge1* e *D344SRE* entrambi Amp^S) di *E. faecium* mancavano di *pbp5*. Il ceppo *D344SRF* era suscettibile a cefalosporine e ampicillina e ciò è dovuto alla delezione spontanea di un frammento del genoma di 170 Kb che include i geni *pbp5* e altri *pbp*. Questa delezione ha avuto origine dall'interazione dei trasposoni coniugativi *Ctn 5386* e *Tn916* (Rise et al., 2007). Il ceppo di laboratorio *Ge1* portava solo l'integrasi di *Tn5801*. La causa della perdita della piattaforma genetica *pbp5* è tutt'ora sconosciuta.

La regione cromosomiale che ospita il gene *pbp5* presenta *Hotspots*

Le presenza di diverse sequenze di inserzione (Iss), all'estremità del gene *pbp5* e di un frammento *psr-pbp5* in *E.hirae* (99% identico a quello trovato su *E. faecium*) suggeriscono la presenza di *hot spot* che potrebbero facilitare la ricombinazione delle regioni contenenti *pbp5*. Per verificare ciò è stato ulteriormente analizzato contesto genico di 8-10 Kb di *pbp5* di 21 isolati *wild type* e 15 transconiuganti inclusi in questo studio insieme a altri genomi di enterococchi. Modelli identici di RFLP di frammenti di 8-10 Kb erano presenti in ogni coppia di donatori e corrispondenti transconiuganti, ma erano diversi da quelli che si verificano naturalmente nei ceppi riceventi *pbp5* *E.faecium* BM4105RF e 64/3. Il sequenziamento di frammenti di modelli RFLP distinti e l'analisi comparativa con ambiente genetico *pbp5* simili nei genomi disponibili in GenBank hanno rivelato 21 varianti di tali frammenti cromosomici di 8-10 Kb. Tre varianti (tipi I- II- III) corrispondevano alle piattaforme trasferibili *pbp5* descritte in questo studio. Il *pbp5* o altri geni sono stati affiancati da una o più sequenze di inserzione della famiglia di IS256 , ISL3 o IS982 (ISEf1, ISEfm1, ISEfal1 o IS1251) in isolati contenenti i tipi da II a XXI, tranne il tipo VIII che aveva CTN5382 (*VanB2*) inserito a valle di *pbp5*. I confini identificabili degli ISs di questa regione di 8-10 Kb di *pbp5*, come anche i nucleotidi comuni in corrispondenza dei quali sono avvenuti gli inserimenti, hanno fatto pensare ad eventi di acquisizione recenti in alcuni hot-spots su una sequenza ancestrale. Nonostante la predominanza del tipo I alcuni sembrano essere associati a ospiti specifici come nel caso del tipo V predominante nei ceppi di maiale e tipo II/II-like, III o XIV presenti negli isolati clinici

La diversità delle sequenze *pbp5* riflette la diversificazione filogenomica di *E. faecium*

Sono state identificate 75 varianti di proteine PBP5 conformi sia ai ceppi AmpR che AmpS. L'albero filogenetico è stato costruito con tutte le sequenze proteiche PBP5 riscontrate in questo studio e quelle disponibili nei database di GenBank. L'albero consta di due cladi principali B e A, che coincidono rispettivamente a cladi associati a popolazioni di non ospedalizzati e isolati ospedalieri (Lebreton et., al 2013). Il Clade B include PBP5 di isolati (PBP-S) di AmpS che corrispondono principalmente a ceppi di sottogruppi BAPS1.2 e 1.5. Alcuni sono simili alla sequenza del prototipo PBP5-S C46 del ceppo di *E. faecium* BM4107 (Sifaoui et al., 2001), ma la maggior parte di essi mostra anche mutazioni nelle posizioni T25A, S39T e D644N, che sono comuni anche alle sequenze PBP5 degli isolati del clade A.

Il Clade A comprende varianti PBP5 raggruppati in due clusters principali ossia il clade A0 e clade A1. La maggior parte di questi isolati hanno la caratteristica di avere mutazioni nelle posizioni V24A , S27G ,E100Q, K144Q, T172A, T324A, N496K, A499T e E525D (Pietta et al 20014). Il

clade A0 comprende le sequenze C30, C31, C37, C52, C53 e C54, corrispondenti agli AmpS di diversi gruppi di isolati di diversi gruppi BAPS (BAPS 1.2, BAPS 2.3a, e BAPS 3.3b) provenienti da diversi ospiti (animali e umani) di diversi paesi. Quasi tutti gli isolati appartenenti al clade A0 portava *pbp5* all'interno di un frammento di tipo I. Sequenze di clade A1 sono state a loro volta suddivise in subclusters che sono in parallelo con le popolazioni di *E.faecium* dei gruppi BAPS2 e 3 (Willems et al., 2012; Tedim et al., 2015). Il subclusters A1S ha al suo interno un sottoinsieme di varianti di PBP5- AmpS (isolati umani e animali del sottogruppo BAPS 2.1). A1M è composto da un sottoinsieme di PBP5- AmpR (molti dei quali associati principalmente a isolati animali di diversi sottogruppi BAPS 2.1b, 2.3a, 2.3b, 3.1, 3.2 e 3,3b) . A1R annovera invece al suo interno quasi tutti i PBP5- AmpR(associati principalmente a isolati clinici di sottogruppi 3.1, 3.3a e 2.1a). Tutti gli isolati del clade A1S, A1M e A1R condividono mutazioni R34Q, G66E, L177I e A216S. Mutazioni invece caratteristiche delle sottostrutture A1S e A1M sono: S39N, A401S piùA4991. Uno dei ceppi A1M possiede anche variazioni su popolazioni specifiche collegate al sottogruppo A1R (A68T, E85D, M485T, V586L, E629V e P667S). Le variati del gruppo A1R sono caratterizzate dalla presenza di sei mutazioni (A68T, E85D, S204G, 466'S/D, M485A/T, E629V, P667S), alcune di queste si trovano nel sito attivo della proteina (466'S/466'D, M485 A/T) e e alla fine di una svolta dei fili B1 e B2 (E629V; P667S) (Fontana et al., 1996; Rica et al., 2004). E' da notare inoltre che alcuni isolati di AmpS (sottogruppi BAPS 3.1, 2.3a e 3.2) con sequenze PBP5 nel sottogruppo A1R (incluso il PBP5 del ricevente *E. faecium* 64/3) manca della mutazione M485A e E629V necessarie per il fenotipo AmpR (Rise et al., 2004). I cambiamenti A68T, E85D e S204G sono stati condivisi dagli isolati AmpS e AmpR del gruppo A1R. Alcuni ceppi hanno mostrato il pattern di mutazioni Q408H, A558T, G582S, K632Q e, infine , V462A, N546T e P642L. Successivamente sono stati analizzati la diversità di altri geni associati ad AmpR (*ddcP*, *ddcY*, *ldtEfm*, *pgtA* *lytG*,) nei genomi disponibili. L'albero filogenetico a singolo locus di PBP5 era congruente con quelli di proteine codificante da *ldtEfm* e *ddcY*) ma non vi era congruenza con *ddcP*, *pgtA* e *lytG*. Quindi l'analisi delle topologie dell'albero genico ha rivelato discrepanze che indicano il trasferimento di *pbp5* tra le popolazioni di *E. faecium* e spiega la presenza di entrambe le varianti *pbp5* in isolati di diversi lignaggi clonali e sequenze PBP5 diverse in ceppi appartenenti agli stessi gruppi filogenomici.

La resistenza all'ampicillina è stata mantenuta senza pressione selettiva.

Sia nei ceppi wild-type che nei rispettivi transconiuganti di *E.faecium* GE1 posti in terreno di coltura senza antibiotico è stata mantenuta la resistenza all'ampicillina denotando quindi che le piattaforme

genetiche acquisite contenenti *pbp5* possono persistere in assenza di pressioni selettive in diversi background genetici. Morfologia e tasso di crescita di tutti i transconiuganti son risultati corrispondenti tra loro e alla normale crescita del ceppo *E. faecium* GE1.

DISCUSSIONE

Questo studio ha avuto il fine di dimostrare l'importanza e la diversità di una vasta regione cromosomica contenente *pbp5* in quasi tutti i genomi di *E. faecium* e una diversificazione parallela tra il gene *pbp5* e il genoma “core” di *E. faecium*. La trasferibilità della regione, analizzata prendendo in esame diversi background clonati, potrebbe migliorare notevolmente l'adattamento di *E. faecium* ai diversi cambiamenti ambientali.

I polimorfismi nelle sequenze delle PBP5 hanno permesso il raggruppamento delle varianti PBP5 in clusters che riflettono la diversificazione filogenomica di *E. faecium* (Galloway-Pena et al., 2012; Lebreton et al., 2013). Lebreton nel 2013 ha proposto un modello di evoluzione di questa specie di enterococchi costituita da una prima divisione in “clade B” e “clade A” coincidente con la convivenza umana ed animale avvenuta 30.000 anni fa e una successiva suddivisione del clade A nelle sottoclassi A1 e A2 dopo l'introduzione degli antibiotici alla fine degli anni 1940. In questo studio sono state individuati due principali clusters di varianti PBP5 indicati come “B”(associati al clade B) e A suddiviso ulteriormente nei sottogruppi A0 (includenti solo gli isolati di AmpS) e A1 che annovera tre gruppi facenti riferimento a differenti popolazioni di *E. faecium* che differiscono nella suscettibilità all'ampicillina: A1S (AmpS da umani sani di diversi gruppi BAPS) A1M (AmpS e AmpR da esseri umani e animali) A1R (AmpR da isolati clinici). Sebbene sia stata suggerita un'acquisizione sequenziale di cambiamenti di aminoacidi nella sequenza della PBP5 (Galloway-Pena et al., 2011; Pietta et al., 2014), questa diversificazione può indicare differenti percorsi evolutivi per AmpR come risposta alle differenti pressioni selettive nei diversi ospiti (Novais et al., 2010).

La regione cromosomica trasferibile di 153 Kb contenente non solo i geni *pbp5* ma anche quelli coinvolti nella sopravvivenza nel tratto gastro intestinale in tutti i genomi analizzati di *E. faecium*, ha contribuito alla forte capacità di adattamento all'intestino dei mammiferi e alla persistenza in ambienti abiotivi. Ia PBP5 è un componente della famiglia Mec, comprendente proteine a bassa affinità naturale per i β -lattamici come la PBP2a (*mecA*) di *Staphylococcus aureus* e PBP3r di *Enterococcus hirae* (99% identico PBP5) (Raze et al., 1998; Hiramatsu et al., 2013). MecA, potrebbe aver contribuito alla sopravvivenza degli stafilococchi ancestrali in presenza degli antibiotici β -lattamici prodotti da funghi e Actinobatteri ed essere stata persa successivamente nel periodo Devoniano con la comparsa dei mammiferi. Questo fatto corrisponde alla separazione e all'

adattamento delle specie stafilococciche a diversi ospiti (Hiramatsu et al., 2013). La recente pressione antibiotica avrebbe poi contribuito in maniera rilevante al trasferimento della PBP2a da ceppi ambientali agli stafilococchi umani. Il contenuto variabile in G+C della piattaforma genetica trasferibile da 153 Kb analizzata in questo studio manifesta eventi di HGT da diverse fonti e, suggerisce che la PBP5 di *E. faecium* si potrebbe esser verificata una storia evolutiva simile a quella della PBP2a degli stafilococchi.

Il trasferimento di *pbp5* nell'ambito di *E. faecium* dovuto a interazioni con i trasposoni Tn5382 o Tn916 e Tn5386 è stato dimostrato solo in pochi isolati (Rise et al., 2005a). Durante il processo di revisione di questo studio, un'opera di Garcia Solache pubblicata nel 2016 ha messo in evidenza che il trasferimento delle regioni cromosomiche contenenti *pbp5* avviene per ricombinazione omologa tra regioni di DNA del donatore e ceppi riceventi arricchiti in AT con un probabile coinvolgimento di plasmidi (Garcia Solache et al., 2016). Elementi simili al Tn916 non stati riscontrati in questo studio, ma in donatori e riceventi sono state evidenziate una banda di dimensioni simili e una sequenza arricchita in AT fiancheggiante la regione trasferita, il che fa ipotizzare una possibile ricombinazione omologa tra il DNA del donatore e DNA ricevente analizzati in questo studio.. Nonostante in questo studio non sia stata rilevata nel transconiugante sequenziato la presenza di geni plasmidici all'interno della piattaforma genetica *pbp5* acquisita, come invece avvenuto nei transconiuganti descritti nello studio di Garcia Solache, non si può completamente scartare questa possibilità vista la presenza di alcune famiglie plasmidiche comuni nei donatori analizzati (Manson et al., 2010; Freitas et al., 2016).

E' inoltre di fondamentale importanza sottolineare come le diverse topologie degli alberi filogenetici dei genomi del nucleo di *E. faecium* e le sequenze *pbp5* ottenute in questo studio riflettano quanto frequentemente possa avvenire il trasferimento genetico di *pbp5* in circostanze naturali (Tripathi and Sowdhamini, 2008). Allo stesso modo, sono state segnalate associazioni filogenetiche atipiche come prova del trasferimento laterale di vari tipi di serina-proteasi nel mondo procariotico (Tripathi and Sowdhamini, 2008). Infatti, evidenze di trasferimento genetico orizzontale *pbp5* (HGT) sembrerebbero presentarsi preferenzialmente in particolari popolazioni, maggiormente favorevoli a mutazioni (il clade A1 ha maggiore tasso di mutazione rispetto al clade B) rendendo quindi più semplice la fissazione e l'evoluzione di *pbp5* seguita dalla loro espansione clonale sotto pressione antibiotica. L'eterogeneità di popolazioni in grado di colonizzare gli esseri umani ha come conseguenza un probabile adattamento positivo a carico alcuni cloni e per la specie nel complesso che è potenziato dall' HGT.

L'apporto necessario di diversi geni per la piena espressione del fenotipo di AmpR è suggerito dai valori della MIC inferiori nei transconiuganti rispetto ai ceppi wild-type, osservato in questo e altri studi (Rise et al., 2005b; Zhang et al., 2012). I fenotipi variabili di suscettibilità all'ampicillina

osservati nei transconiuganti, anche quando si utilizzava lo stesso ceppo ricevente, suggeriscono un trasferimento parziale della piattaforma genetica *pbp5* o l'insorgenza di eventi di ricombinazione che hanno portato a una variazione delle MICs (concentrazioni minime inibenti), che sono riscontrate frequentemente in batteri commensali (Ingle et al., 2016).

Conclusione

L'arsenale di tratti adattativi codificanti nella regione cromosomica contenente *pbp5* ha contribuito al coinvolgimento del gene nell'adattamento di *E. faecium* al tratto gastro intestinale dei mammiferi e alla sua possibile diffusione mediante trasferimento genetico orizzontale, anche in assenza di esposizione ai β -lattamici. I frequenti eventi di trasferimento della piattaforma genetica *pbp5* tra le diverse popolazioni di *E. faecium*, indicherebbero inoltre cambiamenti nell'evoluzione della patogenicità e dell'antibiotico resistenza batterica che si sono verificati in risposta ai cambiamenti demografici, strategie mediche e d'intervento, all'interno della “medicina Hamiltoniana” (Fraser et al., 2005). Questo studio inoltre evidenzia come ci sia un crescente bisogno da parte della microbiologia che studia l'evoluzione delle popolazioni batteriche di confrontarsi con le problematiche mediche (Nesse et al., 2010).