UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA

Curriculum **Tecnologie Biologiche**

PRESENZA DI GENI DI LINEZOLID-RESISTENZA IN ENTEROCOCCHI ISOLATI DA CAMPIONI DI SEDIMENTO E ZOOPLANCTON PRELEVATI IN AREE MARINE COSTIERE

DETECTION OF LINEZOLID RESISTANCE GENES IN ENTEROCOCCI FROM COASTAL MARINE SEDIMENT AND ZOOPLANKTON

Tesi di Laurea Magistrale di:

Rossana Longo

Relatore Chiar.ma Prof.ssa:

Eleonora Giovanetti

Sessione Autunnale (ottobre)

Anno Accademico 2019/2020

A chi mi ha sempre sostenuto e

incoraggiato in questo percorso,

A chi non ha mai smesso di crederci

Mamma, Papà e Giuseppe

Sommario

1.INTRODUZIONE 6

1.1 Oxazolidinoni 10

1.1.1 Linezolid 12

1.1.2. Tedizolid 15

1.1.3 Meccanismo d'azione degli Oxazolidinoni 17

1.2 Meccanismi di resistenza 18

1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S 19

1.2.2 Mutazioni nelle proteine ribosomiali L3 e L4 21

1.2.3 Geni *cfr* e *cfr*(B) 23

1.2.4 Nuove varianti *cfr*: *cfr*(C) e *cfr*(D) 27

1.2.5 Gene *optrA* 29

1.2.6 Co-localizzazione plasmidica di *cfr* e *optrA*. 33

1.2.7 Gene *poxtA* 35

2.MATERIALI E METODI 39

2.1 Siti di campionamento, trattamento dei campioni ed isolamento di enterococchi florfenicolo-resistenti. 39

2.2 Antibiotici e test di sensibilità 40

2.3 Estrazione del DNA totale 41

2.4 Caratterizzazione genotipica degli enterococchi florfenicolo-resistenti 42

2.5 Tipizzazione 44

2.5.1 SmaI-PFGE 44

2.5.2 MLST 45

2.6 Saggi di trasferibilità 46

2.6.1 Coniugazione su filtro 46

2.7 S1-PFGE 47

2.8 Southern-blotting e ibridazione 48

2.9 WGS e analisi di sequenza 49

3. RISULTATI 51

3.1 Ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti, saggi di PCR e test di sensibilità. 51

3.2 Tipizzazione degli isolati mediante SmaI-PFGE 54

3.3 Localizzazione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni e rilevamento di forme circolari 56

3.4 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni. 60

3.5 WGS analisi 63

4. DISCUSSIONE 68

1.INTRODUZIONE

La scoperta degli antibiotici ha consentito di trattare malattie ad eziologia batterica un tempo difficili da curare. Tuttavia, la ricerca di nuove molecole antimicrobiche, molto proficua nei decenni successivi alla scoperta della penicillina, conosce oggi un preoccupante e progressivo rallentamento. Tra il 2008 e il 2012 la "*Food and Drug Administration*" (FDA) ha approvato solo due nuove classi di farmaci nella pratica clinica. Questo arresto nello sviluppo di nuove molecole è aggravato dalla crescente diffusione delle antibiotico-resistenze (AMR), fenomeno che sta rendendo inefficace gran parte delle classi antibiotiche in uso.

La resistenza antimicrobica è, in realtà, un processo naturale nei microrganismi che possono acquisire determinanti di resistenza mediante *Horizontal Gene Transfer* (HGT) con un vantaggio in termini di fitness soprattutto in presenza di una pressione selettiva antibiotica. Tuttavia, i batteri antibiotico-resistenti rappresentano una grave minaccia per la salute pubblica in quanto capaci di diffondere da uomo a uomo, negli animali, negli alimenti e nell'ambiente. Certamente condizioni sanitarie precarie, la mancanza di un approvvigionamento idrico sicuro, l'inadeguatezza delle reti fognare, contribuiscono ad esacerbare il problema. Tra le principali cause della diffusione delle AMR giocano un ruolo rilevante: *(a)* l'uso inappropriato di antibiotici in clinica umana; *(b)* l'eccessivo impiego di antibiotici in zootecnia per promuovere un incremento ponderale e prevenire infezioni in animali sani; *(c)* l'insorgenza di ceppi multi-resistenti (MDR) in ambito nosocomiale che compromettono l'utilizzo di procedure mediche avanzate come trapianti, terapie immunosoppressive e impianti di materiali prostetici; *(d)* i viaggi in Paesi a basso

tenore igienico e la globalizzazione dei mercati; *(e)* i cambiamenti dell'ecosistema a seguito del degrado ambientale.

La resistenza antimicrobica, perciò, è un problema multifattoriale e singoli interventi potrebbero avere un impatto limitato sul suo contenimento.

È ormai evidente la necessità di un'azione coordinata per ridurre al minimo l'emergenza e la diffusione delle AMR. Infatti, sin dai primi anni del 2000, in risposta all'epidemie globali, la società *American Veterinary Medical Association* (AVMA) e l'*American Medical Association* (AMA) si sono fatti promotori di un approccio multidisciplinare – "*One Health*'' – che prevedeva una collaborazione tra le Organizzazioni mediche e veterinarie.

Negli anni successivi altre Organizzazioni come *Food and Agriculture Organization* (FAO), *World Organization for Animal Health* (OIE), and *World Health Organization* (WHO) hanno aderito a questo progetto ribadendo l'importanza di una sorveglianza globale e interconnessa in ambito animale, umano, alimentare e ambientale [1]. Nel 2015 in occasione dell'Assemblea Mondiale della Sanità, il WHO ha approvato un piano d'azione specifico per il controllo delle AMR basato su :*(a)* una migliore consapevolezza e comprensione della resistenza antimicrobica; *(b)* un rafforzamento della sorveglianza e un potenziamento della ricerca; *(c)* una maggiore osservanza delle condizioni igieniche sanitarie; *(d)* un impiego più razionale dei farmaci antimicrobici; *(e)* un piano di investimenti sostenibili nella lotta alla resistenza antimicrobica.

Tuttavia, "la crisi della resistenza agli antibiotici'' non si arresta. Sempre più casi di patogeni resistenti ad antibiotici di ultima generazione, come gli oxazolidinoni, vengono

segnalati in tutto il mondo. Questa nuova classe antibiotica, approvata e commercializzata all'inizio del nuovo millennio, è attiva nei confronti di batteri Gram-positivi inclusi *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), enterococchi vancomicino-resistenti (VRE), pneumococchi e micobatteri multiresistenti (MDR).

Gli enterococchi sono comuni commensali del tratto intestinale di mammiferi e uccelli, ma possono essere isolati anche da varie altre fonti tra cui suolo, piante, alimenti ed ecosistemi acquatici. Nell' intestino umano, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* sono le specie più comuni e anche più spesso responsabili di infezione. Tuttavia, altre specie, come *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus, Enterococcus durans, Enterococcus gallinarum* possono essere coinvolte. Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti a una vasta gamma di agenti antimicrobici tra cui sulfamidici e basse concentrazioni di aminoglicosidi e hanno anche una ridotta sensibilità a molti beta-lattamici.

E. faecalis ed *E. faecium,* sono riconosciuti ormai da anni come importanti patogeni opportunisti soprattutto in ambito nosocomiale dove si rendono responsabili di gravi infezioni quali batteriemie, endocarditi, infezioni del tratto urinario e di ferite post-chirurgiche. Queste due specie enterococciche mostrano un elevato potenziale di patogenicità riconducibile alla loro particolare propensione ad acquisire molteplici determinanti di resistenza mediante HGT [2]. Numerosi studi hanno analizzato la diffusione e circolazione di questi ceppi HiRECC (*High-Risk Enterococcal Clonal Complex*), in particolare VRE, all'interno e tra diverse strutture sanitarie [3].

Un report del 2018 redatto dalla Rete di Sorveglianza Europea della Resistenza Antimicrobica, EARS-Net, [4] registra un incremento della percentuale media ponderata

per la popolazione EU/EEA (*European Union* / *European Economic Area*) dal 10,5% nel 2015 al 17,3% per infezioni sostenute da VRE.

Rari casi, invece, segnalano la presenza di enterococchi resistenti in acque destinate al consumo umano. Questi batteri sono spesso impiegati come indicatori di inquinamento fecale di acque dolci e di balneazione, insieme a *Escherichia coli* [5].

La capacità degli enterococchi di sopravvivere in numerosi habitat naturali e di adattarsi alle diverse condizioni ambientali fanno di questo genere batterico un *central-hub* nella diffusione di geni di resistenza tra batteri Gram-positivi [6].

1.1 Oxazolidinoni

Negli ultimi 30 anni FDA ha approvato solo tre nuove classi antibiotiche: fidaxomicina (o DIFICID) per il trattamento della diarrea associata da *Clostridium difficile*; daptomicina (o CUBICIN), lipopeptide impiegato nelle batteriemie da *S. aureus* e nelle infezioni complicate della pelle causate da Gram-positivi; linezolid (o ZYVOXR), un oxazolidinone somministrabile sia per via endovenosa e che per via orale nel trattamento di gravi infezioni sostenute da MRSA, VRE, polmoniti nosocomiali e comunitarie e infezioni della cute.

La struttura base degli oxazolidinoni è il 2-ossazolidinone: composto organico eterociclico che deriva dall'ossidazione in posizione 2 di un anello ossazolidinico. I primi oxazolidinoni antimicrobici furono identificati presso la società DuPont e brevettati nel 1978. Tra questi un composto della serie 5-idrossimetil-oxazolidinone, *S-6123* (Figura 1)

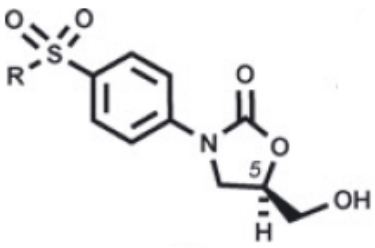

Figura 1. Struttura chimica S-6123. Tratta da Karen et al.; 2011

con modesta attività in vitro su *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e buona efficacia in un modello di infezione murino nei confronti di *S. aureus*.

Nel 1987 durante *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ICAAC) la DuPont rese nota la struttura e le caratteristiche antibatteriche di due nuovi oxazolidinoni Dup 105 e DUP 721 (Figura 2). Entrambi i composti presentavano una

particolare catena laterale al C5 che, secondo gli scienziati, avrebbe potenziato l'attività antibatterica.

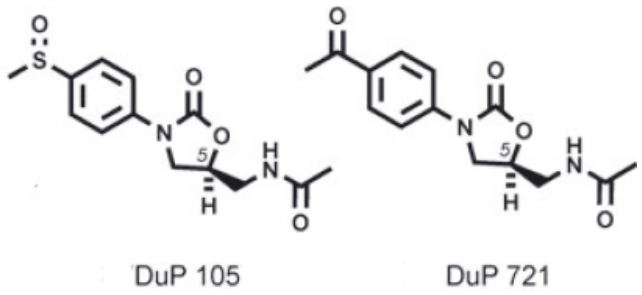

Figura 2. Struttura chimica dei composti DuP105 e DuP721. Tratta da Karen et al.; 2011

Gli studi condotti su questi due prototipi sono stati utili per definire il peculiare meccanismo d'azione degli oxazolidinoni che consiste nel blocco della sintesi proteica.

Inoltre, i farmaci mostravano un'ottima attività nei confronti di Gram-positivi multi-resistenti e, almeno in vitro, non erano insorti mutanti resistenti. In fase preclinica anche la farmacocinetica risultava favorevole. Mediante ulteriori studi su dozzine di oxazolidinoni è stato possibile identificare i primi modelli di struttura-attività, SAR, essenziali per la progettazione di un oxazolidinone attivo (Figura 3).

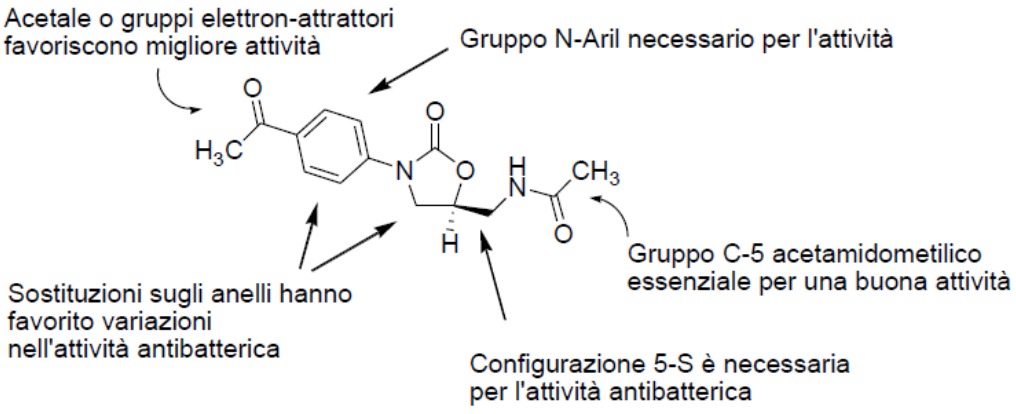

Figura 3. Primo modello SAR (structure activity relationship)

Dal 1922 la società Upjohn scoprì analoghi di oxazolidinoni classificabili in un primo momento in tre differenti sottoclassi: (1) piperazinil-fenil-oxazolidinoni, come PNU-97665; (2) indolinil-oxazolidinoni, PNU-97456; (3) troponil-fenil-oxazolidinoni, PNU-97786. Da numerosi studi emerse che solo i derivati della piperazina mostravano un discreto profilo di sicurezza, una buona solubilità in acqua, un'eccellente farmacocinetica e un'interessante attività antimicrobica in fase preclinica (in vivo e in vitro) verso patogeni Gram-positivi [7].

La società *Upjohn* investì sull'analisi di derivati della piperazina, identificando vari composti tra cui eperizolid e linezolid. In studi preclinici i composti risultarono molto simili per solubilità, potere antimicrobico e spettro d'azione, ma solo il linezolid, per gli ottimi parametri farmacocinetici, raggiunse la fase clinica II [8] e nel 2000 venne approvato per uso clinico dalla FDA e successivamente dall'*European Medicines Agency* (EMA).

Nel 2014 un oxazolidinone di seconda generazione (tedizolid) è stato approvato per il trattamento di gravi infezioni della cute e dei tessuti molli sostenute da Gram-positivi [9].

1.1.1 Linezolid

Linezolid (LZD) è stato il primo oxazolidinone ad essere approvato e commercializzato nel 2000 con il nome di Zyvox®, da *Amershan Pharmacia* (Pfizer) [10].

È un antibiotico indicato per il trattamento di infezioni gravi da Gram-positivi [11] ma con scarso potere antimicrobico nei confronti dei patogeni Gram-negativi. Quest'ultimi, molto

probabilmente, producono dei trasportatori di membrana capaci di riconoscere ed espellere l'antibiotico dalla cellula [12].

Il linezolid ha massa molare di 337,3461 g/mol (Figura 4) e presenta una struttura a quattro gruppi: un gruppo A, eterociclo centrale ossazolidinico; un gruppo B, N-arile legato all'azoto dell'anello A e un gruppo C con funzione stabilizzante. Il gruppo N-aril-oxazolidinone è essenziale per l'attività del farmaco, così come la configurazione sterica S del C-5 e il gruppo acil-amino-metilico legato al C-5 dell'anello A (Figura 4). Il sostituente fluoro-aromatico e il gruppo morfolinico in posizione para, sono responsabili rispettivamente di una maggiore disponibilità del farmaco e di una farmacocinetica più favorevole; entrambi i sostituenti contribuiscono ad incrementare l'idrosolubilità e a ridurre la tossicità.

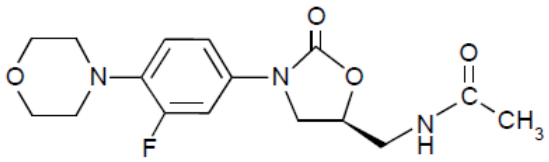

Figura 4. Struttura chimica di Linezolid. Tratta da Pfizer. 2010. Zyvox R (linezolid) package insert.

Le prime indicazioni dell'esatto sito di legame di linezolid sul ribosoma risalgo a studi di mutagenesi effettuati nel 1999 [13]. Il sito d'azione del farmaco nelle cellule batteriche è il PTC (*peptidyl transferase centre*), collocato al centro della subunità ribosomiale 50S, nella parte inferiore della fessura dove le estremità 3' del aminoacil-tRNA e del peptidil-tRNA sono posizionate per il trasferimento del peptide [12] (Figura 5).

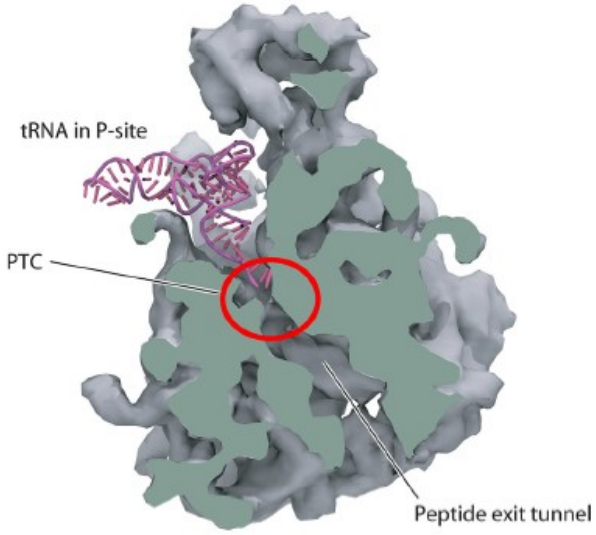

Figura 5. Sezione sagittale della subunità ribosomiale con un cerchio rosso in corrispondenza del PTC. Tratto da Long & Vester; 2012

Il legame del linezolid al ribosoma causa il blocco dell'elongazione della catena peptidica e della formazione del complesso tRNAfMet-mRNA-70S.

Studi cristallografici del complesso antibiotico-subunità ribosomiale 50S, hanno sottolineato che il linezolid condivide parzialmente il suo sito di legame con altri antibiotici che inibiscono la sintesi proteica: cloramfenicolo, clindamicina, tiamulina e streptogramina-A. Le differenze nelle modalità di azione degli antibiotici devono essere attribuite ai loro siti di legame sovrapposti ma non identici e al modo in cui influenzano i nucleotidi vicini in combinazione con la loro modalità di accesso, affinità per il sito e costanti di associazione e tasso di dissociazione.

La valutazione in vitro dell'attività antibatterica di linezolid, indica valori di MIC_{50} di 2-4 mg/L negli stafilococchi, 2-4 mg/L negli enterococchi e 1-2 mg/L negli streptococchi. Piccole variazioni nella determinazione ed interpretazione dell'endpoint possono essere

imputate rispettivamente alla metodica utilizzata (microdiluizione in brodo e in agar, ed E-test), e alle linee guida prese come riferimento (EUCAST o CLSI) [16].

L'innovazione di linezolid è la somministrazione sia per via parenterale (IV), soluzione isotonica sterile pronta all'uso con 2 mg di antibiotico per ogni ml; che per via orale (PO), compresse rivestite con film contenenti 400/600 mg, mantenendo sempre la stessa efficacia [14]. Tale modalità di somministrazione consente di passare da IV a O senza un aggiustamento della dose, riducendo così i tempi di ospedalizzazione del paziente [15].

Seppur ritenuto un farmaco sicuro, la sua somministrazione per lunghi periodi può causare effetti collaterali anche di una certa entità come ad esempio trombocitopenia, neuropatia ottica, neuropatia periferica e acidosi lattica. È opportuno, quindi, effettuare controlli durante la terapia: esami epatici e renali, ed emocromo completo ad intervalli regolari.

1.1.2. Tedizolid

Il tedizolid (TZD) è un oxazolidinone di seconda generazione, approvato per uso clinico nel 2014 dalla FDA, precedentemente noto come torezolid (*Trius Therapeutics and Dong-A Pharmaceuticals*) e commercializzato con il nome di Sivextro ®. Il tedizolid è da quattro a otto volte più attivo in vitro rispetto al linezolid contro stafilococchi, streptococchi ed enterococchi [17;18]. La natura stericamente compatta della catena laterale idrossimetilica in posizione C5 è ritenuta responsabile della sua elevata attività antimicrobica e della sua azione anche sui ceppi linezolid-resistenti. L'aggiunta di una quarta struttura ad anello (D-ring) e la presenza di un gruppo metilico che sostituisce quello acil-amino-metilico in C5 dell'anello A, aumentano la disponibilità di siti di legame per interazioni *H-bond*,

stabilizzando ulteriormente il legame del farmaco con il target (Figura 6) [19]. La posologia del tedizolid, grazie a un'emivita migliore del farmaco, prevede una dose giornaliera di 200 mg per 6-10 giorni, rispetto a 600 mg per 12 ore previsti per linezolid. Come osservato durante la terapia con linezolid, sono comuni effetti collaterali nausea, cefalea, diarrea, e vomito. L'impiego di tedizolid, però, è associato a un minor rischio di insorgenza di complicanze gravi quali neuropatie ottiche e periferiche (FDA, 2019).

Sin da subito il tedizolid fu reso disponibile anche nella versione di profarmaco, tedizolid fosfato (Figura 6). Questa formulazione somministrabile per via orale era rapidamente convertita in vivo nella forma bioattiva, tedizolid. Il profarmaco a differenza del tedizolid presentava un gruppo monofosfato legato alla catena laterale idrossimetilica al C5 che conferiva un profilo di sicurezza superiore, una maggiore solubilità e biodisponibilità [12].

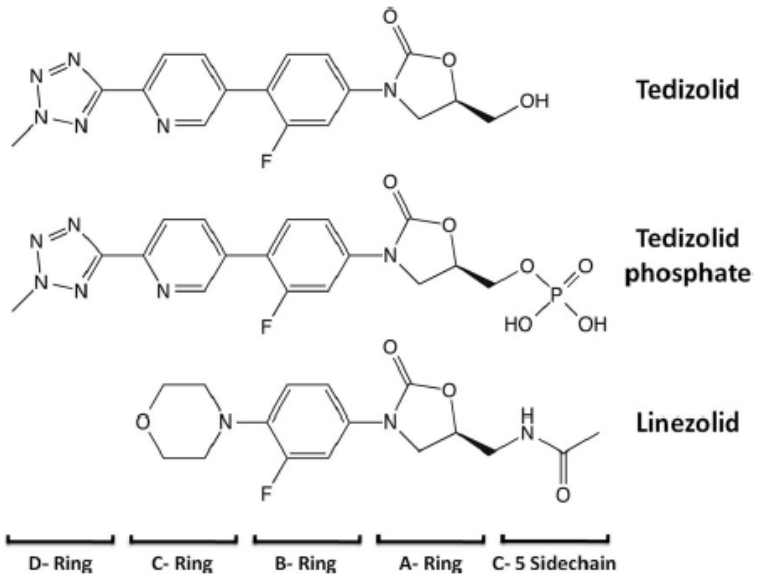

Figura 6. Strutture chimiche di Tedizolid, Tedizolid fosfato e Linezolid a confronto. Tratto da Jeffrey et al.; 2015

1.1.3 Meccanismo d'azione degli Oxazolidinoni

Grazie a ulteriori studi cristallografici sulla subunità maggiore 50S di *Deinococcus radiodurans* è stato possibile approfondire la conoscenza riguardo al sito target [10;20]. Il linezolid si inserisce, nello specifico, nella porzione aminoacilica del sito A che lega un tRNA (Figura 7A e 7B), composta da nucleotidi filogeneticamente conservati del rRNA 23S. In particolare, il nucleotide U2585, che ha la funzione di coordinare il corretto posizionamento del tRNA nel sito P, in presenza di linezolid assume un orientamento differente suggerendo che questo cambiamento sia la causa del blocco della traduzione.

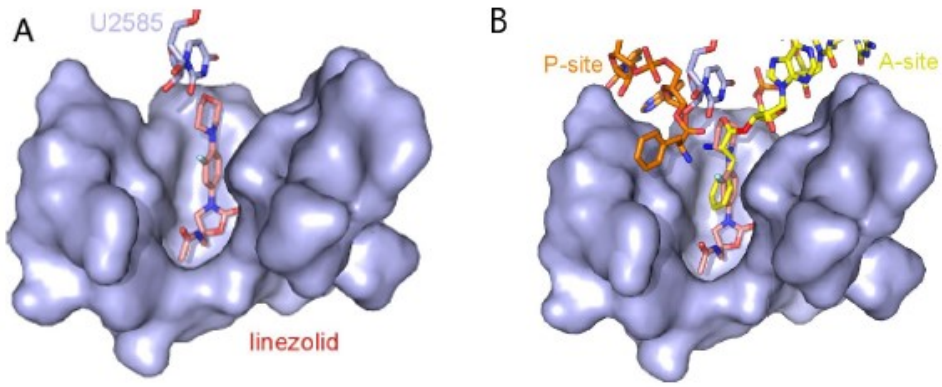

Figura 7. (A) Tasca di legame del linezolid (rosa) su D50S; (B) rappresentazione complessiva del PTC: sito P (in arancione), il nucleotide U2585 (in blu) e il sito A (in giallo).

In Figura 8, si può notare che il linezolid non impedisce il legame del complesso ternario ma, dopo l'idrolisi del GTP e il rilascio di EF-Tu, la sistemazione dell'amminoacil tRNA in arrivo nel sito A e il legame peptidico con l'amminoacil-tRNA già presente nel sito P, sono ostacolati dalla presenza del farmaco; ciò comporta il rilascio del tRNA e l'arresto della traduzione.

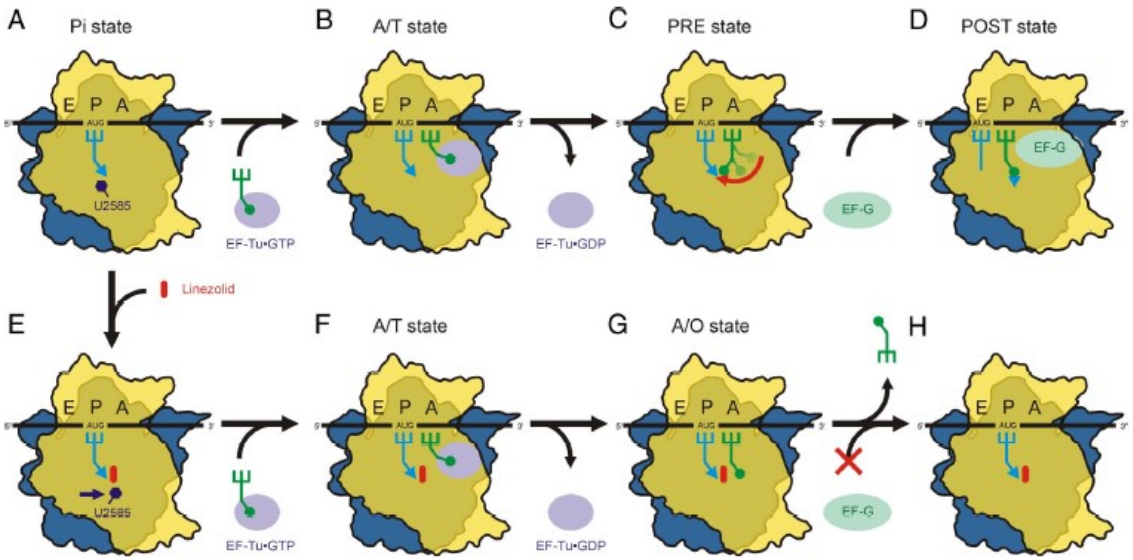

Figura 8. Meccanismo di traduzione in assenza (A-D) e in presenza (E-H) di linezolid. Tratto da Wilson et al.; 2008.

1.2 Meccanismi di resistenza

La natura sintetica degli oxazolidinoni ha indotto a ritenere che fenomeni di resistenza sarebbero comparsi con grande difficoltà [21;22]. In realtà, già dopo un anno dall'approvazione del linezolid da parte della FDA, si sono manifestati sporadicamente i primi fenomeni di resistenza agli oxazolidinoni in ceppi di origine clinica [23-25] e, a seguire, in ceppi di origine animale.

I principali meccanismi di resistenza diffusi tra stafilococchi ed enterococchi sono riconducibili alla comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22, e all'acquisizione di determinanti di resistenza trasferibili (*cfr, cfr*(B), *cfr*(C), *cfr*(D), *optrA e poxtA*) (Figura 9).

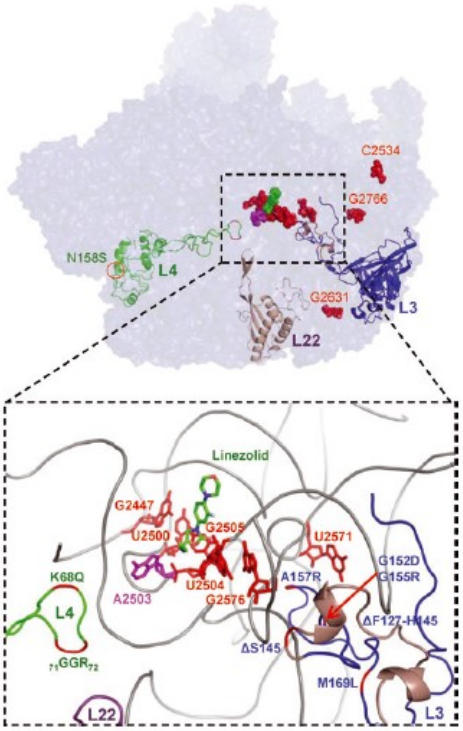

Figura 9. Principali mutazioni responsabili della resistenza al linezolid mappati sulla subunità ribosomiale 50S di E.coli. L3 in blu, L4 in verde e rRNA 23S in grigio. Tratto da Karen et al., 2011.

1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S

Il sito di legame del linezolid al PTC è composto interamente da RNA e, fino a poco tempo fa, la mutazione dell'rRNA 23S era l'unico meccanismo di resistenza al linezolid noto. La tasca di legame è rivestita da nucleotidi altamente conservati [G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585 (numerazione riferita a *E. coli*)] che interagiscono direttamente con il linezolid. I ceppi selezionati per la resistenza al linezolid hanno mutazioni del rRNA 23S nei nucleotidi G2061, C2452, A2503, U2504 e G2505, siti di legame preferenziali per il farmaco, ma anche in nucleotidi più distanti dal sito target, come A2062, G2447, A2453, C2499, U2500 e G2576 (Figure 9 e 10). In particolare, la

mutazione G2576 nel dominio V del gene 23S rRNA è risultata responsabile del fenotipo di resistenza negli enterococchi [16].

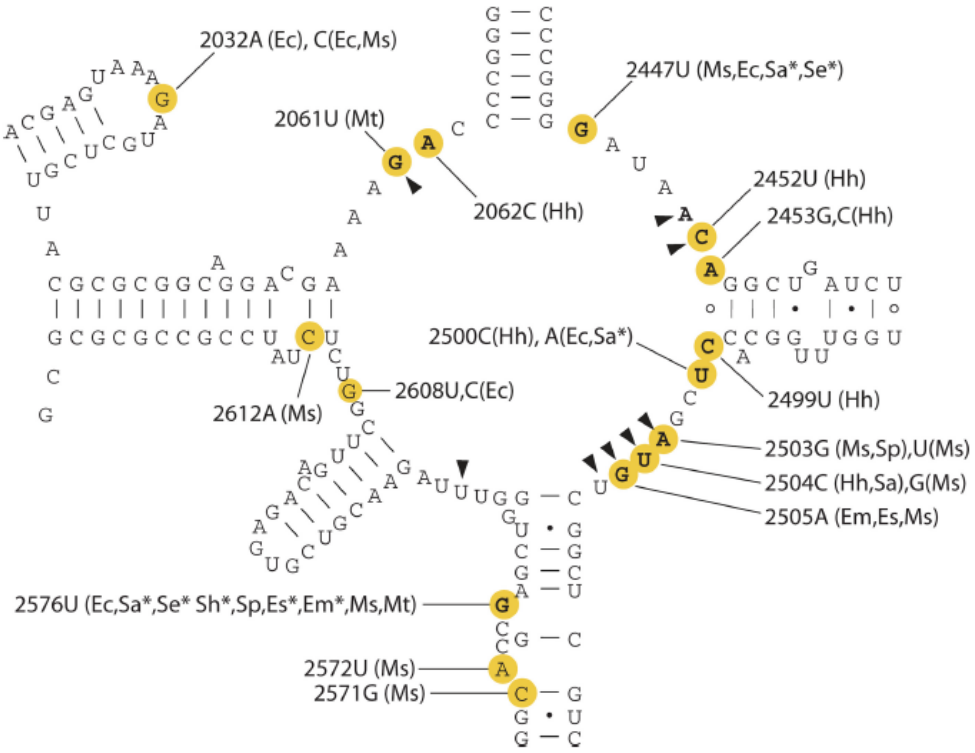

Figura 10. Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA 23S (sequenza di Mycobacterium smegmatis e numerazione di E. coli). I triangoli neri indicano i nucleotidi che interagiscono con il linezolid. I cerchi gialli evidenziano i nucleotidi che vanno incontro a mutazione; in grassetto sono rappresentate le mutazioni che conferiscono un incremento significativo della MIC di linezolid (>4 volte). Le mutazioni e gli organismi corrispondenti sono indicate con due lettere: Ec (E. coli), Sa (S. aureus), Se (Staphylococcus epidermidis), Sh (Staphylococcus haemolyticus), Sp (Streptococcus pneumoniae), Es (E. faecalis), Em (E. faecium), Ms (M. smegmatis), Mt (Mycobacterium tubercolosis), Hh (Halobacterium halobium). Gli asterischi indicano mutazioni descritte in ceppi di isolamento clinico. Tratto da Long & Vester,2012

Inoltre, la maggior parte dei batteri possiede geni codificanti per gli rRNA organizzati in copie multiple di operoni: in *S. aureus* da 5 a 7 operoni, *E. faecalis* più comunemente 4 operoni e in *E. faecium* fino a più di 7 operoni. Considerata la variabilità nel numero di copie di rDNA 23S, si potrebbe supporre che il grado di resistenza degli isolati sia associato al rapporto tra alleli mutati e *wild-type*. Diversi studi suggeriscono una correlazione tra la presenza di un numero elevato di copie di alleli mutanti di G2576U ed elevati valori di MIC di linezolid in ceppi clinici di *S. aureus, E. faecalis ed E. faecium*

[26]. In alcune prove eseguite in ceppi di *E. faecium* è stato osservato che ad un incremento del numero di copie di alleli mutanti di G2576U (0, 1, 2 o 3, e 4 o 5 copie di alleli mutati) era associata una graduale diminuzione della sensibilità al linezolid per valori crescenti di MIC (2, 8-16, 32 e 64 mg/L rispettivamente).

Un'altra mutazione, la G2505A, è stata identificata in mutanti resistenti di *E. faecium* ottenuti in vitro.

In realtà, la frequenza di mutazioni multiple in grado di conferire livelli più elevati di resistenza, è molto bassa poiché associata ad un elevato costo di fitness per il batterio. Solitamente, un incremento nel numero di copie di alleli mutati di G2576U si verifica in ceppi isolati da pazienti sottoposti a lunghi cicli di terapia con linezolid [22], sottolineando l'importanza di un impiego razionale di linezolid in ambito clinico [12]. Il costo di fitness associato alle mutazioni ribosomiali, pertanto, varia enormemente anche in funzione del microrganismo. Alcuni batteri tollerano mutazioni in posizioni nell'rRNA 23S che risultano letali per altri: una mutazione della resistenza può manifestarsi insieme a una mutazione compensatoria la quale riduce il costo di fitness per il microrganismo; o ancora la presenza di una seconda mutazione, in grado di agire sinergicamente con quella della resistenza, potenzierebbe la resistenza del batterio al farmaco [27].

1.2.2 Mutazioni nelle proteine ribosomiali L3 e L4

Altre mutazioni associate a una minore sensibilità verso gli oxazolidinoni, sono state descritte per geni codificanti le proteine ribosomiali: L3 (*rplC*), L4 (*rplD*), e L22 (*rplV*).

La proteina ribosomiale L3 occupa principalmente la superficie della subunità 50S estendendosi in parte anche nel PTC (Figura 11); L4, invece, è più dislocata rispetto al PTC, in corrispondenza del canale attraverso il quale i peptidi nascenti escono dal ribosoma. La prima mutazione nella sequenza amminoacidica di L3 è stata riscontrata in *E. coli* per selezione con tiamulina, antibiotico che condivide lo stesso sito bersaglio del linezolid [28].

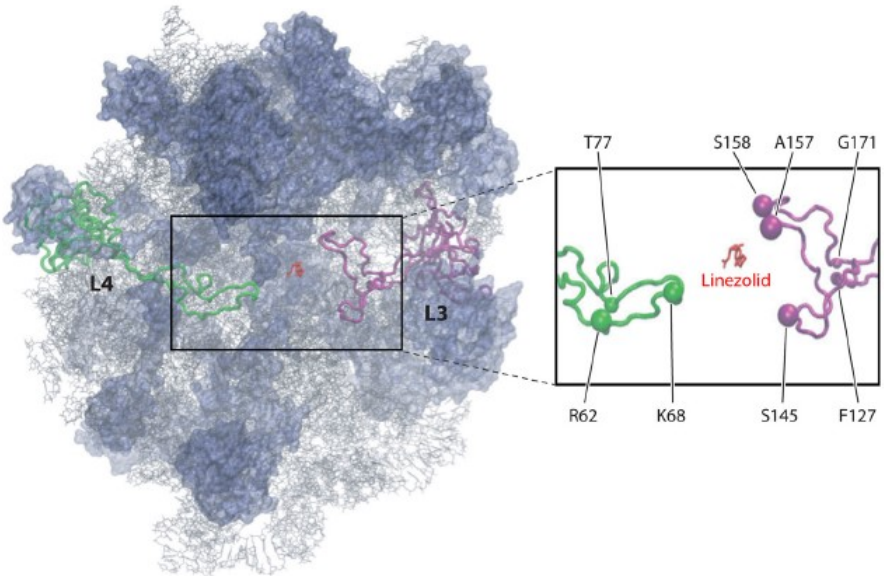

Figura 11. Illustrazione di come sono posizionate le proteine L3 (in viola) e L4 (in verde) rispetto al sito di legame per linezolid (rosso). Tratto da Long et al.,2012

Il fatto che mutazioni in L3 e L4 potessero essere indotte in vitro dal linezolid, ha consentito di ipotizzare che esse potessero rappresentare un meccanismo di resistenza al farmaco in *S. aureus, Staphylococcus cohnii* e *S. epidermidis* [16].

Mutazioni nel gene *rplC* (F127L e A157R), incrementano di due volte il valore delle MIC di linezolid di stafilococchi di laboratorio e clinici. È stato osservato che ceppi linezolid-resistenti di *S. pneumoniae* presentavano mutazioni nel gene *rplD* responsabili di

sostituzione amminoacidica a livello del residuo K68 (K68N o K68Q) o consistevano in inserzioni e/o delezioni nei residui $_{71}$GGR$_{72}$, $_{65}$WR$_{66}$, E$_{68}$KG$_{69}$.

È interessante notare che la maggior parte delle mutazioni nelle proteine ribosomiali, riscontrate nei campioni batterici analizzati, riguardano L3 piuttosto che L4, probabilmente per la stretta vicinanza dei residui di L3 al PTC. Alcuni scienziati hanno verificato che la co-presenza di mutazioni nell'rRNA 23S e in L3 ha un'azione sinergica nella maggior parte dei casi, richiedendo, così, un minor numero di copie mutate degli alleli di 23S rRNA e minimizzando i costi di fitness associati alle mutazioni dell'rRNA 23S.

Poco, invece, è noto riguardo alle mutazioni del gene che codifica per la proteina L22 in presenza delle quali, la resistenza agli oxazolidinoni è spesso associata a resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramine di gruppo B (MLS_B) [8]. Si ritiene che il meccanismo di resistenza sia paragonabile a quello conferito da mutazioni in L3 e L4, ciò anche in considerazione del fatto che L22 è situata in prossimità del sito di legame del linezolid.

1.2.3 Geni cfr e cfr(B)

Il gene *cfr* (*chloramphenicol and florfenicol resistance*) generalmente localizzato su elementi genetici mobili, è stato il primo gene in grado di conferire resistenza trasferibile agli oxazolidinoni. La sua prima descrizione risale al 2000 su plasmidi multi-resistenti isolati durante una sorveglianza della resistenza al florfenicolo su stafilococchi di origine animale [29]. In isolati di *Staphylococcus sciuri* di origine suina è stato identificato e sequenziato il primo plasmide *cfr* (17.108 bp): pSCFS1.

Le proteine codificate da *cfr* appartengono alla superfamiglia delle S-adenosil-metionine (SAM) che includono proteine che generano specie radicali attraverso un clivaggio riduttivo. Le proteine appartenenti a questa superfamiglia sono coinvolte in una moltitudine di reazioni e di processi che includono: metilazione, isomerizzazione, ossidazione anaerobica e sintesi di poliammine.

Il gene *cfr* codifica una metiltransferasi che, come RlmN enzima cellulare autoctono, metila un residuo nucleotidico del rRNA23S. A differenza di RlmN che monometila l'atomo C2 di A2503 del dominio V del rRNA, Cfr catalizza la metilazione post-trascrizionale dell'atomo C8 di A2503. Studi di selezione in vitro dimostrano che l'efficacia del tedizolid è preservata in presenza del gene *cfr* [30]. Questo probabilmente è dovuto al fatto che la base A2503 non è direttamente coinvolta nel legame con questo antibiotico.

In pSCFS1 sono presenti ulteriori altri geni di resistenza antimicrobica tra cui *erm* (resistenza MLS_B), *lsaB* (ridotta sensibilità ai lincosamidi) (Figura 12).

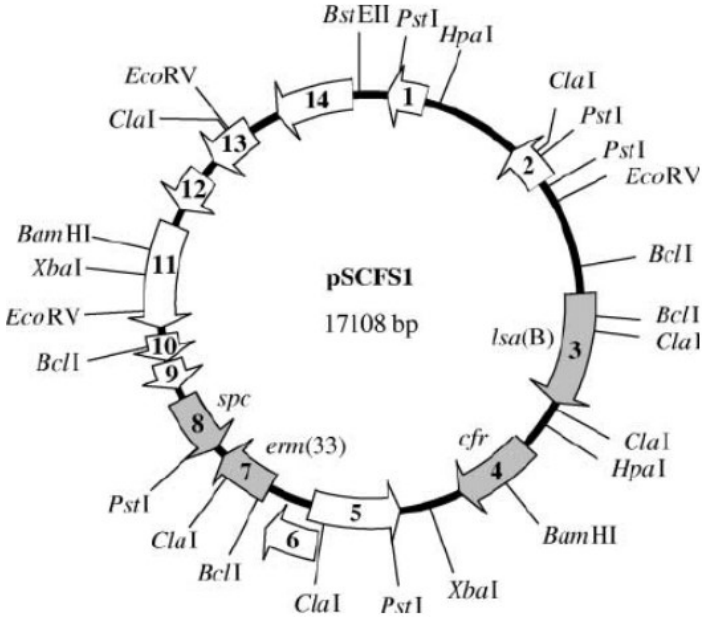

Figura 12. Rappresentazione circolare del plasmide multi-resistente pSCFS1 isolato in Staphylococcus sciuri. Sul plasmide oltre a cfr sono presenti diversi geni di resistenza erm, lsa(B), spc. Tratto da Stefan Schwarz, '' Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from Staphylococcus sciuri''.

Nel 2005 è stato documentato il primo MRSA *cfr-positivo*. L'isolato possedeva su l'elemento trasponibile *cfr* ed *ermB*, entrambi co-trascritti in un unico operone (*mlr*): *cfr* metilava il C8 di A2058 ed *erm*B era responsabile della dimetilazione al N6 del residuo prossimo a A2058 (resistenza MLS_B) [8]. Pertanto, concomitanti variazioni nucleotidiche a livello del rRNA 23S potrebbero conferire resistenza combinata a cinque diverse classi di antibiotici che interagiscono con residui limitrofi al PTC [31], fenotipo MDR (*multi-drug resistance*), meglio conosciuto con l'acronimo $PhLOPS_A$ (*phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A*). Ognuna di queste cinque classi di farmaci include importanti agenti antimicrobici attualmente in uso in medicina umana e/o veterinaria. *cfr* è inoltre responsabile di una ridotta sensibilità ai macrolidi a 16 atomi di carbonio.

Ad oggi, il gene è stato identificato sia in batteri Gram-positivi (*Staphylococcus, Enterococcus, Macrococcus, Bacillus, Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) che Gram-negativi (*Proteus* ed *Escherichia*) [32;33]. *cfr* è quasi sempre fiancheggiato da IS (sequenze di inserzione), più comunemente da IS256, IS*Enfa*4, IS21-558 e IS1216, che mediano gli eventi di ricombinazione promuovendo la sua diffusione [32].

Negli enterococchi, la prima segnalazione di *cfr* in un isolato animale di *E. faecalis* risale al 2010 (pEF-01); la proteina Cfr differiva dal *wild type* di *S. sciuri* per due amminoacidi [34]. Da allora, sono stati descritti solo pochi enterococchi *cfr*-positivi, i contesti genetici tuttavia, mostravano delle differenze con il plasmide pEF-01 (Figura 13).

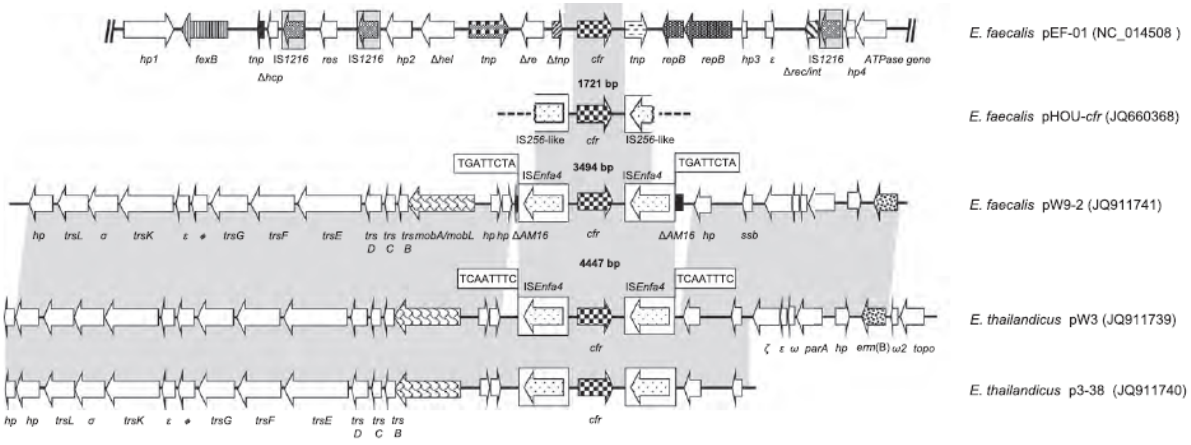

Figura 13. Confronto dei contesti genetici del gene cfr in plasmidi di Enterococcus spp. Tratto da Shen et. al.

Tuttavia, le conoscenze sul meccanismo di resistenza codificato da *cfr* negli enterococchi e sul suo reale contributo alla linezolid-resistenza sono ancora incomplete [35].

Inoltre, è stato osservato che negli enterococchi esistono due isoforme del gene *cfr*: una è molto simile a *cfr* degli stafilococchi, l'altra è quasi identica a un gene *cfr-like* di *Peptoclostridium difficile* localizzato su un trasposone composito, Tn*6218*. La sequenza proteica codificata dal gene *cfr-like* di *E. faecium*, isolato da pazienti ospedalizzati,

condivideva una identità amminoacidica del 99,7% con quella trovata nel *P. difficile* (*GenBank accession numbers* KM359438, KM359439, CP003939, HG002389, e HG002396); mentre solo del 74,9% con le proteine codificate da geni precedentemente identificati negli stafilococchi e negli enterococchi non-fecali, pertanto è stato denominato *cfr*(B) (Figura 14) [36].

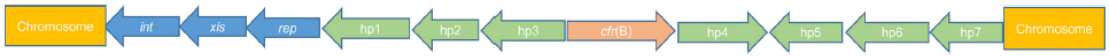

Figura 14. Rappresentazione schematica del contesto genetico di cfr(B)

Da ulteriori studi è emerso che gli isolati di *P. difficile* che portano *cfr* mostrano valori di MIC di linezolid elevati, nonostante il farmaco non sia prescritto per il trattamento dell'infezione da *P. difficile* [37]. Alcuni scienziati ritengono che il batterio possa aver acquisito la resistenza nel suo habitat naturale, l'intestino umano, che può fungere da ampio *reservoir* di determinanti di resistenza [38]. Tuttavia, negli isolati di *Enterococcus spp*. i livelli di resistenza al linezolid erano modesti (MIC, 8 mg/L) e non presentano il fenotipo PhLOPS$_A$ tipico da *cfr*. L'origine dei geni *cfr-like* e la loro diffusione all'interno di diverse strutture genetiche resta da chiarire.

1.2.4 Nuove varianti cfr: cfr(C) e cfr(D)

1.2.4.1 cfr(C)

Una nuova variante *cfr*, *cfr*(C), è stata segnalata durante una sorveglianza in isolati di *Camplyobacter* provenienti da allevamenti bovini di cinque stati degli Stati Uniti. Tra i campioni analizzati, un isolato di *Campylobacter coli* (Tx40) mostrava inaspettatamente

elevati valori di MIC di cloramfenicolo e di florfenicolo (32 mg/L). Test di trasferibilità risultarono utili per dimostrare che la resistenza a linezolid, fenicoli, lincosamidi e pleuromutiline (*Campylobacter* spp è naturalmente resistente alle streptogramine) era mobilizzabile a ceppi di *Campylobacter jejuni* e *C. coli* sensibili. Successivamente, tramite S1-PFGE e analisi di sequenza, venne identificato un plasmide (pTx40) di 48 kb contente 47 ORF di cui 22 codificanti per proteine a funzione nota. Tra le ORF codificanti per proteine ipotetiche, si notò la presenza di un gene di 1.140 bp che codificava una proteina di 379 aminoacidi. Quest'ultima mostrava un'elevata similarità con le proteine SAM, ma un'identità del 55.1% e 54.9% rispettivamente con *cfr* di *S. sciuri* e *cfr*(B) di *E. faecium*. Si ipotizzò che questo gene *cfr-like* codificasse per una nuova proteina in grado di conferire resistenza agli antibiotici e successivi esperimenti di clonaggio la confermarono. *cfr*(C) è stato il primo caso di gene *cfr* rivenuto in un agente patogeno di origine alimentare. Ad oggi, *cfr*(C) è principalmente osservato in isolati di *Campylobacter* ma non è da sottovalutare la sua potenziale diffusione ad altre specie batteriche dato che il gene è localizzato su un plasmide coniugativo [39].

1.2.4.2 cfr(D)

Recentemente Guerin *et al*. [40] hanno identificato e completamente sequenziato un'altra variante del gene *cfr*, *cfr*(D), da un isolato clinico di *E. faecium* (15-307.1). Il ceppo 15-307.1 era fenotipicamente resistente ad ampicillina, gentamicina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, cloramfenicolo, tetraciclina, linezolid, vancomicina e teicoplanina, mentre rimaneva sensibile alla daptomicina e alla tigeciclina. In particolare, le MIC di linezolid e tedizolid erano elevate,16 e 4 mg/L rispettivamente. L'analisi WGS

dell'intero genoma del batterio ha confermata la presenza di geni di resistenza tra cui *vanA*, *optrA*, *erm*(A), *erm*(B), *tet*(L), *tet*(M), oltre che *cfr*(D).

cfr(D), localizzato su un plasmide da 103 kb, codifica una proteina di 357 aminoacidi filogeneticamente distante dalle altre varianti poiché condivide un'identità amminoacidica < del 65% con Cfr, Cfr(B), Cfr(C). Tuttavia, appartiene alla superfamiglia delle SAM poiché presenta il motivo conservato CX3CX2C ricco di cisteina. Inaspettatamente, test di clonaggio e trasferimento del plasmide che porta *cfr*(D) hanno mostrato un fenotipo di resistenza $PhLOPS_A$, tipico di *cfr* e *cfr*-like, solo in *E. coli*. Gli autori non sono ancora in grado di spiegare tale fenomeno; saranno necessarie ulteriori indagini per chiarire il meccanismo di resistenza.

1.2.5 Gene optrA

Ulteriore meccanismo di resistenza trasferibile agli oxazolidinoni, diffuso prevalentemente in *E. faecalis*, è quello codificato dal gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*). Nel 2005, in Cina, è stato osservato il primo isolato clinico umano di *E. faecium* che trasportava il gene *optrA*. Solo nel 2015 fu determinato e reso noto il contesto genetico di *optrA*. Da allora, enterococchi *optrA*-positivi sono stati segnalati in tutto il mondo [41]. Il gene *optrA* è stato osservato su un plasmide, pE349, isolato da un ceppo clinico di *E. faecalis* linezolid-resistente, ma negativo per la presenza di *cfr* e mutazioni ribosomiali [42]. Il plasmide pE349 (3.6331 bp) (*GenBank accession number* KP399637) presentava 39 ORF codificanti per proteine con più di 50 amminoacidi. Durante la ricerca di potenziali geni di resistenza, fu individuato un gene di 1.968 bp codificante per una

proteina di 655 amminoacidi con identità del 99.4% rispetto a una presunta proteina ABC di *E. faecalis* (*GenBank accession number* EJU90935.1) e di *E. faecium* (*GenBank accession number* EJY24646.1). Studi di clonaggio e screening del fenotipo suggerirono che il gene codificante per il trasportatore ABC mediasse una resistenza combinata ad oxazolidinoni e fenicoli in *E. faecalis* e *S. aureus*. Si osservò, infatti, che di tutte le ORF presenti sul plasmide, 18 codificavano per proteine con funzione nota: OptrA e FexA coinvolte nella resistenza, RepB e RepC nella replicazione plasmidica, e MobA, PrgI, TraE, Tnp e TraG negli eventi coniugativi (Figura 15). *optrA*, quindi, responsabile della resistenza a fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo) e oxazolidinoni (incluso il tedizolid), fa parte della famiglia di proteine ABC-F ed è filogeneticamente correlato a *vga*(A), *vga*(C), *vga*(E) e *lsa*(E) che conferiscono resistenza a lincosamidi, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A. Da sorveglianze condotte in Cina emerge che *optrA* è maggiormente diffuso negli enterococchi di origine animale, piuttosto che in isolati umani. Il fenomeno è probabilmente legato all'utilizzo eccessivo di florfenicolo in zootecnica per il trattamento di infezioni enteriche, respiratorie e genitali. Inoltre, una volta escreto, il florfenicolo rimane bioattivo nel suolo e potrebbe esercitare una pressione selettiva anche sui batteri ambientali, promuovendo la diffusione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni [43].

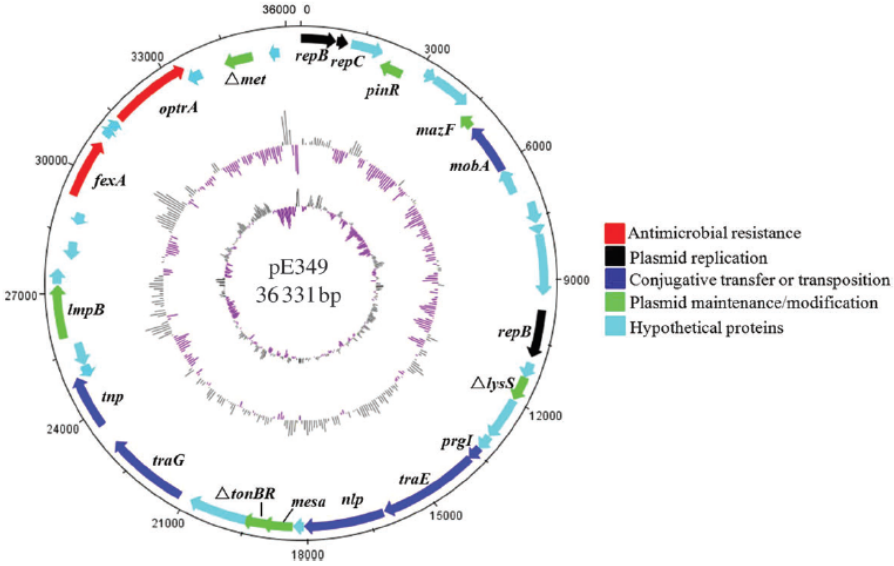

Figura 15. Rappresentazione schematica del plasmide pE349 di E. faecalis E349. Tratto da Wang et al.;2015

Recentemente è stato chiarito il meccanismo d'azione della proteina codificata dal gene *optrA*. Si tratta di una proteina *ATP binding cassette* (ABC) di tipo F che media la resistenza attraverso la protezione della subunità ribosomiale 50S, target di numerosi farmaci [44] (Figura 16). La proteina ARE ABC-F è composta da singoli polipeptidi contenenti due domini di legame nucleotidici conservati (NBD) separati da un linker di 80 aminoacidi di composizione variabile, senza domini transmembrana (TMD).

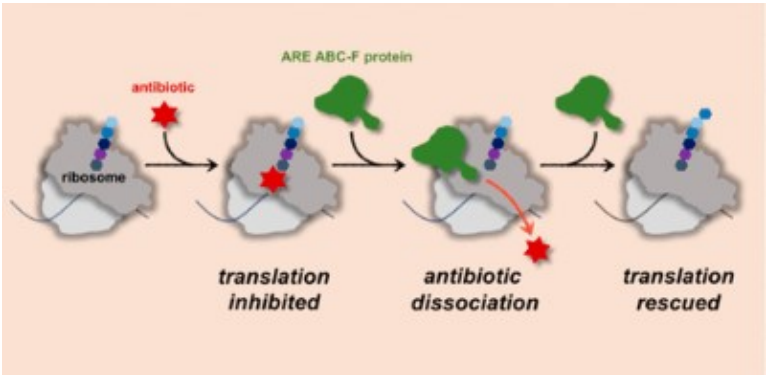

Figura 16. Meccanismo d'azione della proteina ABC. Tratto da Sharkey e O'Neill, 2018.

Secondo Ero *et al*. [45] la proteina ABC-F si inerisce nella regione PTC/NPET (*Nascent Peptide Exit Tunnel*), stabilizzando il tRNA nel sito P del ribosoma. Allo stesso tempo ciò comporta cambiamenti conformazionali che favoriscono il rilascio del farmaco; solo dopo l'idrolisi dell'ATP legata alla proteina ABC-F si avrà il suo rilascio, verrà ricostituita la conformazione naturale del ribosoma e la traduzione potrà riprendere (Figura 17).

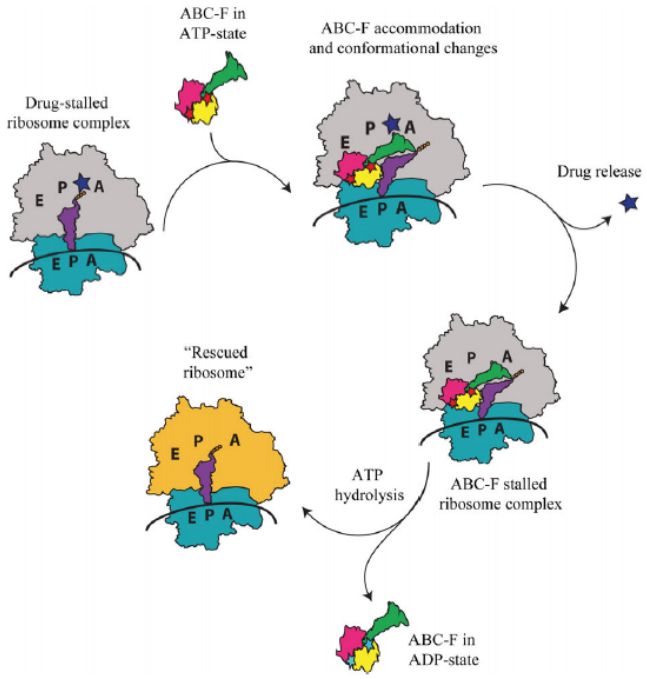

Figura 17. Rappresentazione schematica del meccanismo di protezione ribosomiale da parte delle proteine ABC-F. La stella blu indica il sito PTC/NPET, target dell'antibiotico. Le stelle rossa e azzurra indicano, rispettivamente, il legame della proteina ABC-F con ATP e ADP. Tratto da Ero et al.

Del gene *optrA*, come *cfr*, si conoscono diverse varianti. Dal confronto di tutte queste varianti finora descritte è emerso che quella italiana (*optrA*$_{E35048}$) differisce dal *wild-type* (E349) molto più (20 sostituzioni amminoacidiche) di quanto non avvenga con le varianti cinesi che mostrano un limitato numero di sostituzioni. Allo stesso tempo, non è ancora del tutto chiaro come queste sostituzioni vadano ad impattare sul fenotipo di resistenza a fenicoli e oxazolidinoni. Considerando, infatti, un isolato di *E. faecium optrA*-positivo in cui si rilevavano oltre 21 sostituzioni di amminoacidi [46], mostrava un valore di MIC di

linezolid (4 mg/L) identico a quello di isolati cinesi con altre varianti di OptrA, suggerendo che il numero di sostituzioni amminoacidiche abbia scarsa influenza sul livello di resistenza al linezolid.

Dall'analisi microarray di una collezione di isolati clinici di *Enterococcus spp*. raccolti durante la sorveglianza a livello globale SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) è emerso che un grande numero di riarrangiamenti genetici sarebbe correlato alla diffusione in tutto il mondo del gene *optrA*. I contesti genetici restano pressoché gli stessi, ma il gene *optrA* può essere localizzato nel cromosoma, su plasmidi di diverse dimensioni o su trasposoni, come Tn*554*, Tn*558*, e fiancheggiato da elementi di inserzione, IS*1216*.

Sebbene finora *optrA* sia stato descritto in *E. faecalis*, questo gene è stato documentato anche in *S. sciuri* sul plasmide che porta anche *cfr*, in *E. faecium* e in altri batteri Gram-positivi [47-49].

1.2.6 Co-localizzazione plasmidica di cfr e optrA.

Dalla prima descrizione del gene *optrA* in *E. faecalis* ed in *E. faecium* [42], questo gene è stato identificato su vari plasmidi di diverse dimensioni o a livello cromosomico in enterococchi umani e animali. In alcuni casi, *optrA* era presente anche in combinazione con *cfr, cfr*(B) o *poxtA* nello stesso ceppo o sullo stesso plasmide. Li *et al*. [45] hanno descritto in un ceppo di *E. faecalis* di origine suina, un nuovo trasposone cromosomico della famiglia Tn*554* chiamato Tn*6674* (12.932 bp), che trasportava, oltre ad *optrA*, anche altri geni di resistenza come *spc* per la resistenza alla spectinomicina*, erm*(A) ai macrolidi, e *fexA* ai fenicoli.

Indagini più dettagliate su uno dei due enterococchi clinici *optrA*- e *cfr* - positivi isolati in Italia (*E. faecium* E35048) hanno portato poi alla caratterizzazione di un plasmide di 41,8 kb (pE35048-oc) sul quale i due determinanti di resistenza risiedono ad una distanza di circa 23.1 kb [49]. pE35048-oc possiede regioni con elevata similarità (96% di identità nucleotidica) con pRE25 (50 kb) plasmide coniugativo MDR [50], ma a differenza di questo non risultava trasferibile per coniugazione o trasformazione. Una co-localizzazione di *optrA* e *cfr* è stata riportata anche in un altro plasmide di 72,9 kb (pF120805) isolato in un ceppo clinico di *E. faecium*. Le due strutture che condividono lo scheletro pRE25-*like*, e i relativi contesti genetici di *optrA* e *cfr*, sono messi a confronto in Figura 18.

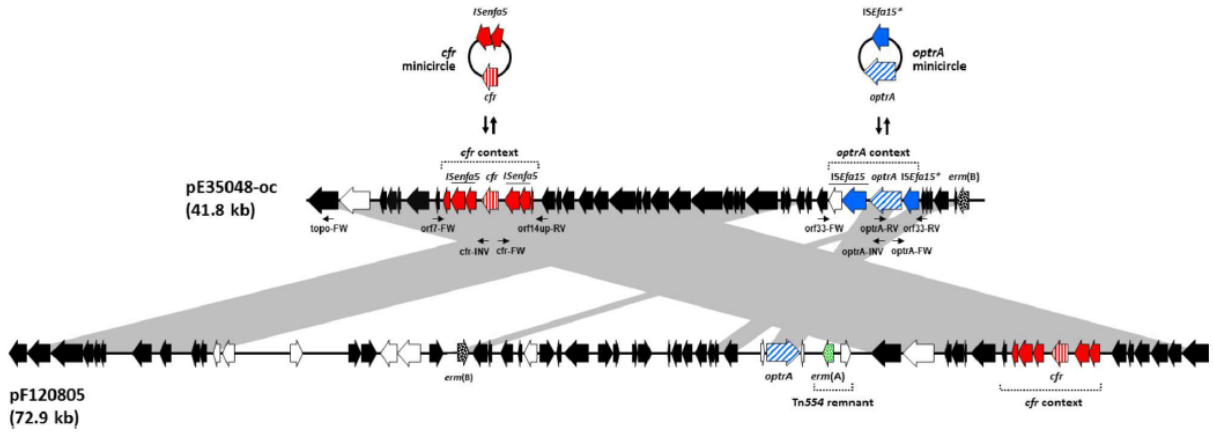

Figura 18. Confronto dei contesti genetici di cfr ed optrA in pE35048-oc di E. faecium E35048 e in pF120805 di E. faecium F120805. Tratto da Morroni et al.

Dall'analisi dei contesti genetici dei geni di linezolid-resistenza nei due plasmidi, non si rilevano differenze tra i contesti genetici di *cfr,* mentre emergono differenze sostanziali per quanto riguarda quelli di *optrA*. In pF12-0805, infatti, il gene è associato alla porzione di Tn*554* che porta *erm*(A), mentre in pE35048-oc il contesto *optrA* è localizzato a valle del gene *erm*(B). Va inoltre sottolineato che, a differenza di quanto si verifica in pE35048-oc, in pF12-0805 l'assenza di sequenze d'inserzione ai lati di *optrA* non ne consente l'escissione. La presenza di IS, con lo stesso orientamento od opposto, a fiancheggiare

optrA promuove la formazione di minicircoli attraverso la ricombinazione tra le due copie di IS (Figura 19) [51].

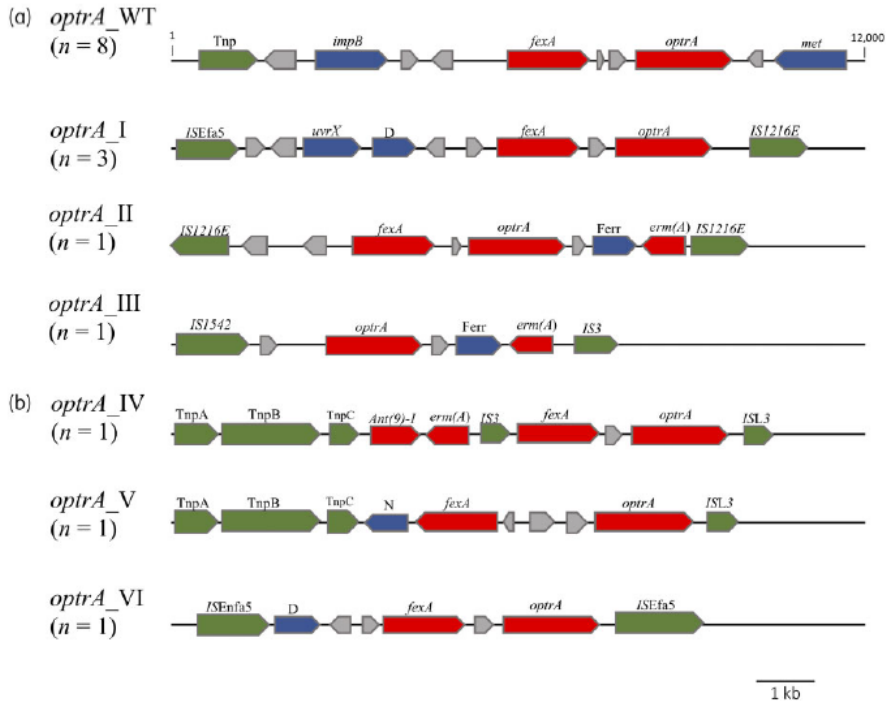

Figura 19. Rappresentazione schematica dei loci del gene optrA in ceppi clinici di E. faecalis ed E. faecium isolati in Irlanda. Le diverse varianti, a localizzazione plasmidica (a) o cromosomica (b), sono allineate al prototipo optrA-WT (Wang et al. nel 2015). In rosso i geni di antibiotico-resistenza, in verde le IS/trasposasi, in blu le proteine conosciute e in grigio le proteine ipotetiche.

1.2.7 Gene poxtA

Recentemente, un altro membro della sottofamiglia della proteina ABC-F, PoxtA (*after phenicols, oxazolidinones and tetracyclines*), è stato scoperto in un MRSA di origine clinica e successivamente in clostridi ed enterococchi. È in grado di ridurre la sensibilità a fenicoli, oxazolidinoni e tetracicline, attraverso un meccanismo di protezione ribosomiale [52]. Inaspettatamente, però, quando il gene *poxtA* veniva espresso in *E. coli* produceva una diminuzione della sensibilità agli oxazolidinoni più marcata di quanto avveniva

esprimendo il gene in cocchi Gram-positivi. Fenomeno associabile a differenze nel livello di espressione genica o a differenze nell'interazione di PoxtA con il target ribosomiale nelle diverse specie. La prevalenza di *poxtA* in *Enterococcus spp*. è attualmente oggetto di indagine.

Nel 2015, il primo ceppo MRSA (AOUC-0915) recante *poxtA* è stato isolato in Italia da un paziente affetto da fibrosi cistica che era stato sottoposto a trattamento con linezolid e presentava già altri meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni: *cfr* e mutazione in L3. Nel 2019, Papagiannitsis *et al*. segnalano il primo ceppo clinico di *E. faecium poxtA*-positivo in Grecia. Tuttavia, la maggior parte dei ceppi *poxtA*-positivi descritti ad oggi è di origine animale [Elghaieb *et al*., 2019; Freitas *et al*., 2019; Kang *et al*., 2019]. Ciò ha indotto a ritenere che la selezione del gene possa essere avvenuta nel serbatoio animale come del resto si è verificato anche per altri geni di resistenza ai fenicoli, alla tetraciclina e ad altri antibiotici ampiamente utilizzati in medicina veterinaria.

Una ricerca BLAST, utilizzando una sequenza *poxtA* come *query*, ha evidenziato la presenza del gene in Gram-positivi isolati da animali tra cui *E. faecalis 12* (*GenBank accession number* KII46686.1), *E. faecium P36* (*GenBank accession number* KP834591.1), *Pediococcus acidilactici BCC1* (*GenBank accession number* CP018763.1) ed *E. faecalis 599* (*GenBank accession number* EJU87034.1) di origine non specificata. Questi dati avvalorano l'ipotesi che *poxtA* sia trasferibile. A conferma di ciò, l'analisi del contesto genetico di *poxtA* in *S. aureus* AOUC-0915, mostra che il gene è inserito in una struttura che assomiglia a un trasposone composito e fiancheggiato da due IS simili a IS*1216* (IS*1216*_U e IS*1216*_D) nello stesso orientamento (Figura 20). Questa organizzazione è abbastanza conservata negli altri ceppi analizzati: in *P. acidilactici* la

IS*1216*, a monte del gene *poxtA*, ha orientamento opposto rispetto a quella del *S. aureus*, mentre in *E. faecium* è presente una sola copia di IS*1216*, posizionata a valle del gene.

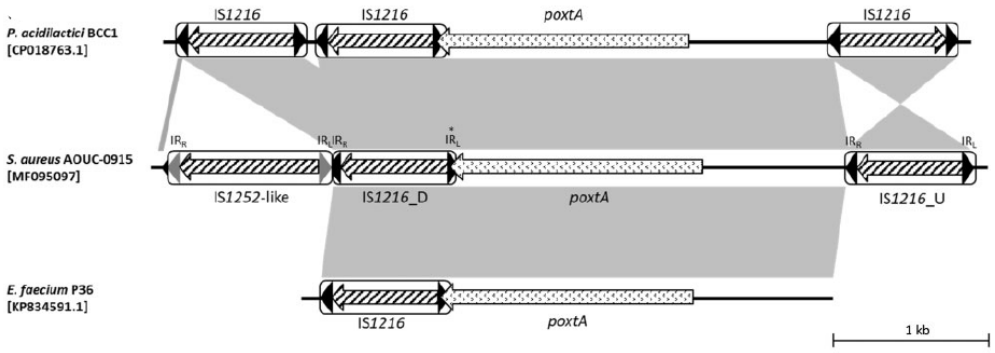

Figura 20. Confronto del contesto genetico di poxtA in batteri Gram-positivi. Tratto da Antonelli et al.,2018

Recentemente è stato caratterizzato l'elemento genetico che trasporta *poxtA* [53]. Il gene *poxtA* è associato a un trasposone composito da 48 kb, denominato Tn*6349*, integrato sul cromosoma batterico. L'inserzione interrompe la sequenza codificante una ATPasi del profago ϕN315-*like*. Il trasposone è delimitato da due IS*1216* e porta diversi geni di resistenza tra cui *erm*(B) responsabile del fenotipo MLS_B, *cfr* fenotipo $PhLOPS_A$, e *fexB* resistenza ai fenicoli. Inoltre, risulta fiancheggiato da una piccola sequenza diretta e ripetuta di 8 bp (5'-AAACAAAT-3'), coinvolta nel meccanismo di duplicazione e trasposizione dell'elemento genetico (Figura 21). La struttura a mosaico di Tn*6349* ha suggerito che questo elemento abbia avuto origine dalla ricombinazione tra un plasmide pE35048-oc-*like* e il trasposone composito Tn*6657* che porta *poxtA* e *fexB*, seguito dalla co-integrazione nel profago.

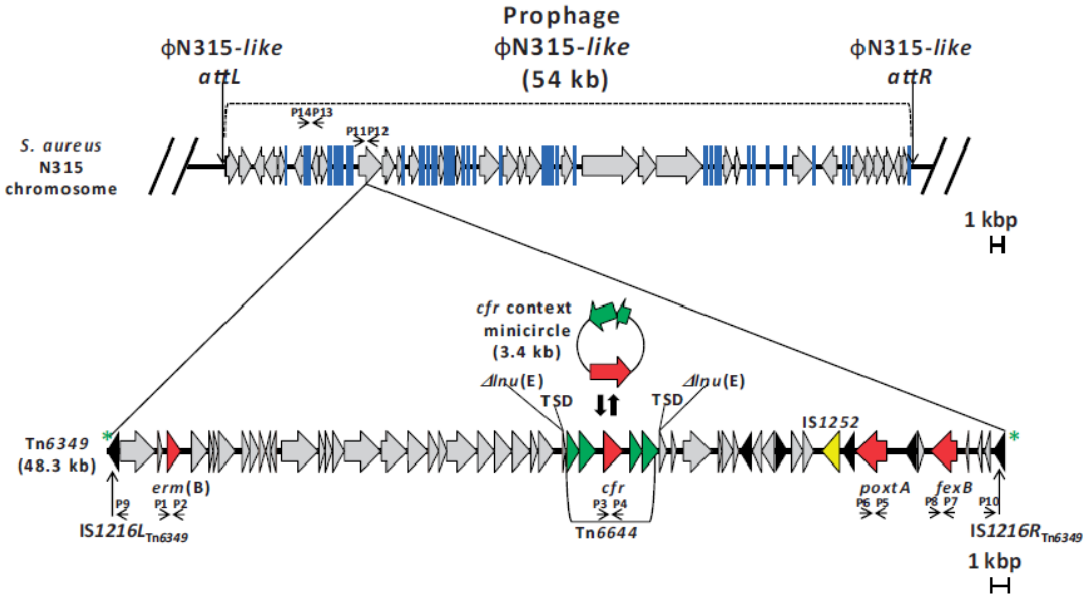

Figura 21. Struttura di Tn6349 e dei contesti genetici; integrazione nel cromosoma di MRSA AOUC-0915. Tratto da D'Andrea et al.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Siti di campionamento, trattamento dei campioni ed isolamento di enterococchi florfenicolo-resistenti.

Le attività di campionamento sono state svolte in due aree situate nel Mar Ligure e nel Mar Adriatico, nell'ambito di un progetto finalizzato al monitoraggio di antibiotico-resistenze in batteri di origine marina. I siti di campionamento nel Mar Ligure erano di fronte al porto e all'ospedale della città di Genova, mentre i siti di campionamento nel Mar Adriatico erano di fronte a un'area urbana in prossimità dell'estuario del fiume Esino e di una raffineria di petrolio e di fronte all'ospedale regionale di Torrette (Figura 22). Tutti i campioni sono stati raccolti nel luglio 2019. I campioni venivano incubati per una notte a 37 °C in brodo azide (Oxoid, Basingstoke, UK) per l'arricchimento selettivo degli enterococchi. I sedimenti (5 g ciascuno) erano immediatamente aggiunti al brodo di arricchimento, mentre i campioni di acqua, dai quali ottenere lo zooplancton, erano processati come segue. L'acqua di mare (400 ml) veniva prima filtrata attraverso membrane da 0,22 µm (Merk Life Science, Milano, Italia), quindi i filtri erano incubati in 30 ml di brodo azide. I campioni di zooplancton venivano centrifugati per 10 minuti a 15000 x g e i pellet risospesi in 5 ml di acqua di mare sterile artificiale e aggiunti a 40 ml di brodo azide. Ciascuna coltura di arricchimento (100 µl) è stata distribuita su piastre di agar Slanetz Bartley integrate con florfenicolo (10 mg/L) per la selezione degli enterococchi resistenti.

Figura 22. Vista dal satellite delle due aree di campionamento situate nel Mar Ligure e nel mare Adriatico. I siti di campionamento sono indicati da spot bianchi. EN, Esino Nord; EF, Esino Fronte; ES, Esino Sud; TF, Torrette Fronte; GEN, Genova Nord; GES, Genova Sud

2.2 Antibiotici e test di sensibilità

Gli antibiotici utilizzati nei test di sensibilità, ad eccezione del tedizolid, sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich Co, Milano). Prima dei saggi, florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tetraciclina venivano risospesi ad una concentrazione finale di 10 mg/L nei solventi appropriati (etanolo per il florfenicolo e per il cloramfenicolo, acqua per il linezolid e tetraciclina) e conservati a -20°C. Per quanto riguarda il tedizolid, non disponendo della polvere, si è fatto uso di strip per E-test (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia). La MIC è stata determinata mediante microdiluizione in brodo o attraverso E-test e i valori ottenuti sono stati interpretati coerentemente con i *breakpoint* suggeriti dal

CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) (Tabella 1). *E. faecalis* ATCC 29212 è stato utilizzato come ceppo di riferimento.

	BREAKPOINT *ENTEROCOCCUS* SPP. (MG/L)		
	S	I	R
FLORFENICOLO	N.D.[a]	N.D.	N.D.
CLORAMFENICOLO	≤ 8	16	≥ 32
LINEZOLID	≤ 2	4	≥ 8
TEDIZOLID	≤ 0.5	-	≥ 1
TETRACICLINA	≤ 4	8	≥ 16

Tabella 1. Breakpoint suggeriti dal CLSI relativi agli antibiotici saggiati. Dal momento che il florfenicolo non viene utilizzato in pratica clinica, ma è ad esclusivo uso veterinario, i breakpoint non sono disponibili.

[a]N.D. non disponibile.

2.3 Estrazione del DNA totale

Per l'estrazione del DNA dai campioni è stato utilizzato il kit di estrazione della *ThermoFisher Scientific*. Dalle colture in piastra, mediante tampone, è stata raccolta una quantità di circa 2 x 10^9 cellule batteriche per ogni campione, che era inizialmente stemperata in 1 ml d'acqua (o soluzione fisiologica) e centrifugata per 10 minuti alla massima potenza. Il pellet ottenuto era così risospeso in 180 µl di *Lysis buffer* (a pH 8.0 e contenete 20mM di Tris HCl, 2mM di EDTA e 1.2 % di Triton x-100) e 20 mg/ml di lisozima per ogni campione. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C, a ciascun campione venivano aggiunti 200 µl di *Lysis solution* e 20 µl di Proteinasi K; si procedeva ad una incubazione di 30 minuti a 55 °C. Successivamente, venivano aggiunti 20 µl di

RNAse Solution e i campioni erano incubati per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni, dopo l'aggiunta di 400 µl di etanolo al 50%, erano quindi vortexati. Infine, dopo aver trasferito il contenuto della eppendorf in una colonnina già attivata fornita dal kit, si procedeva con una centrifugazione di un minuto. Seguivano due lavaggi con 500 µl di *Wash buffer*, l'eluizione con 200 µl di *Eluition buffer* e infine, una centrifugazione per un minuto per ottenere il DNA. I campioni così ottenuti venivano conservati ad una temperatura di -20°.

2.4 Caratterizzazione genotipica degli enterococchi florfenicolo-resistenti

Gli enterococchi florfenicolo-resistenti selezionati su *Slanetz Bartley* integrato con florfenicolo (10 mg/L), sono stati sottoposti a *screening* mediante PCR per la presenza dei geni di resistenza al linezolid: *cfr*, *optrA* e *poxtA.* Le coppie di primer utilizzate nelle reazioni di amplificazione sono riportate in Tabella 2.

L'analisi è stata effettuata utilizzando *DreamTaq polymerase* (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Il mix di reazione utilizzato per ciascun campione era come di seguito riportato: 5 µl di *Buffer DreamTaq* 10X, 38.1 µl di H_2O, 1 µl di dNtp, 0.3 µl primer *forward*, 0.3 µl di primer *reverse*, 0.3 µl di *DreamTaq polymerase*. Al mix venivano aggiunti 5 µl di DNA del ceppo in esame per un volume totale di 50 µl.

Per studiare l'escissione dei contesti genetici che trasportano geni di resistenza al linezolid, sono stati eseguiti saggi PCR usando coppie di primer esterni rispetto alla locazione dei geni di resistenza al linezolid. (Tabella 2).

Gene	Primer	Sequenza (5'→3')	Taglia amplicon(bp)
cfr	[a]cfr-FW	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746
	cfr-RV	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	
optrA	[a]optrA-FW	TACTTGATGAACCTACTAACCA	422
	optrA-RV	CCTTGAACTACTGATTCTCGG	
poxtA	[a]poxtA-FW	GAACGCTTGGAGTATTTCGACTTC	778
	poxtA-RV	CTGGACTGAGAATACCCATC	
optrA *fexA*	[b]optrAdiv-FW	GAAAAATAACACAGTAAAAGGC	
	fexAdiv-RV	CGCATCTGAGTAGGACATAGC	
poxtA	[b]poxtAdiv-FW	GACGAGCCGACCAACCACCT	
	poxtAdiv-RV	TTCAGGCGGACAAAAATCCAA	

Tabella 2. Primer utilizzati in questo studio. [a] coppie di primer utilizzate anche per ottenere le sonde specifiche; [b] coppie di primer utilizzata per il rilevamento di forme circolari.

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

2.5 Tipizzazione

2.5.1 SmaI-PFGE

La tipizzazione degli isolati è stata effettuata mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). La metodica prevede la restrizione del genoma batterico con enzimi che tagliano infrequentemente sequenze specifiche di DNA (*SmaI-nuclease* della ThermoFisher Scientific), previa inclusione di esso in blocchi di agarosio. È possibile così impedire la rottura spontanea del DNA in soluzione e originare un ridotto numero di frammenti (5-20) con elevato peso molecolare (fino a 10 Mb). I frammenti ottenuti vengono separati utilizzando l'elettroforesi in campo pulsato che, a differenza dell'elettroforesi convenzionale, sfruttando un campo elettrico pluridirezionale, consente la separazione di frammenti di grandi dimensioni. Per ciascun ceppo batterico è stato così ottenuto un profilo di restrizione specifico (*fingerprint*).

La SmaI-PFGE è stata eseguita mediante il protocollo descritto da Ripa *et al.* [54]. I batteri sono stati fatti crescere overnight in 5 ml di brodo di *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) a 37°C. Il giorno seguente i campioni sono stati diluiti di un fattore 1:10 ed è stata misurata la densità ottica (OD) a 675 nm in modo tale da ottenere una concentrazione di DNA pari a 10 µg/ml. La coltura così ottenuta veniva centrifugata e lavata con 0.5 ml di *TEN Buffer* (29.22 g di NaCl, 5 ml di Tris-HCl 1M, 10 ml di EDTA 0.5 M e H_2O distillata per un volume totale di 500 ml) e risospese in 0.5 ml di *TEN Buffer* a cui è stato aggiunto uno stesso volume di *low-melting-point agarose* (Bio-Rad, Hercule, USA) all'1,6%. La miscela veniva fatta fluire in appositi stampi o *plug-mold*, lasciata solidificare a 4°C per formare i

blocchetti di agarosio o *plug*. Seguiva un'incubazione a 37°C per 24 ore in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1 mg/ml) e RNasi A (50 µg/ml) (Sigma). Al termine dell'incubazione, ad ogni plug venivano quindi aggiunti 3 ml di *Digestion Buffer* contenente proteinasi K (0,5 µg/ml); si procedeva con una nuova incubazione a 50°C per 24 ore. A questo punto si effettuavano 3 lavaggi con 10 ml di *TE Buffer* (Tris EDTA). Metà plug veniva incubata overnight con 30 U di SmaI (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. La restrizione veniva interrotta aggiungendo 1 ml di EDTA 0,5 M. Successivamente ciascuna plug veniva posta su un pettine e inclusa in un gel di *Pulsed Field Certified Agarose* (Bio-Rad) all'1%. Le corse elettroforetiche in *TBE* (Tris Borato EDTA) *Buffer* sono state effettuate tramite l'apparecchiatura *Chef Mapper XA System* (Bio-Rad) con le seguenti condizioni: tempo 22 ore, campo 6 V/cm, *switch* iniziale 1 secondo, *switch* finale 30 secondi, *ramping factor* lineare. Per stimare le dimensioni frammenti di DNA ottenuti dei ceppi analizzati, sono stati utilizzati come pesi molecolari di riferimento il *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, Ipswich, USA) e *Lambda Marker* (Promega, Madison, USA). Infine, per consentire la visualizzazione delle bande ottenute, il gel è stato colorato con bromuro d'etidio (0,5 mg/ml) e visualizzato al transilluminatore.

2.5.2 MLST

Multilocus sequence typing (MLST) è una procedura di tipizzazione che consente di identificare e di tracciare la diffusione globale di isolati batterici patogeni o antibiotico-resistenti. Ciò è possibile poiché si avvale di ampio database disponibile sul web che consente un approccio innovativo all'epidemiologia molecolare [55].

La ST (*sequence type*) di ciascun isolato è stata determinata, dopo WGS (vedi paragrafo 2.9) attraverso il *Center for Genomic Epidemiology*(https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/) e il database MLST (https://pubmlst.org/general.shtml).

2.6 Saggi di trasferibilità

2.6.1 Coniugazione su filtro

La trasferibilità dei geni di resistenza al linezolid è stata verificata tramite esperimenti di coniugazione su filtro. Gli enterococchi che risultavano possedere geni di resistenza sono stati utilizzati come donatori, mentre *E. faecium* 64/3 (Werner 97) sensibile a linezolid (MIC ≤ 2 mg/L) e florfenicolo (MIC ≤ 4 mg/L) ma resistente all'acido fusidico e alla rifampicina, è stato impiegato come ricevente.

Per ogni esperimento il ceppo donatore e quello ricevente, venivano seminati su due differenti piastre di *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubati per 24h. Il giorno seguente, delle colonie di donatore e ricevente erano inoculate in brodo BH fino al raggiungimento di una densità ottica OD_{675} di 0,4 e poi filtrati attraverso filtri di nitrocellulosa da 0,45 µm (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Si procedeva, quindi, alla rimozione sterile del filtro che poi era posizionato al centro di una piastra preriscaldata di BH agar e incubato overnight a 37°C. Successivamente, i batteri risultati adesi sulla superficie del filtro venivano rimossi immergendo il filtro in 10 ml di soluzione fisiologica sterile e vortexando. La sospensione batterica veniva quindi centrifugata a 8.000 rpm per 10 minuti;

il pellet così ottenuto era risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile (intero). Per assicurarsi che i batteri fossero in un numero tale da poter essere contati, si procedeva con delle diluizioni scalari fino alla 10^{-13} per la conta delle CFU/ml di donatore e ricevente: piastre selettive di BH erano inoculate con 10 µl di tutte le diluizioni.

Per la selezione dei transconiuganti 100 µl di sospensione batterica, prelevati dalla provetta dell'intero fino alla diluzione 10^{-5}, venivano spatolati sulla superficie di piastre di BH contenenti florfenicolo (8 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Dopo 24/48 ore di incubazione a 37°C si procedeva alla conta delle colonie. Le frequenze di coniugazione sono state espresse come numero di UFC/ml di transconiugante per cellula ricevente.

Per confermare il trasferimento genico, i transconiuganti sono stati testati per la presenza di geni di resistenza al linezolid mediante PCR; per la loro sensibilità a florfenicolo, linezolid tramite determinazione della MIC. Il background genetico di riceventi e transconiuganti è stato confermato mediante SmaI-PFGE.

2.7 S1-PFGE

La S1-PFGE è stata eseguita per una preliminare analisi del plasmidoma dei ceppi. Il procedimento è simile a quello descritto nel paragrafo 2.5.1 con alcune modifiche. Il DNA viene digerito con S1-*nuclease* (ThermoFisher Scientific); le condizioni di corsa prevedevano un campo elettrico di 6 V/cm, switch iniziale 1 secondo e switch finale 20 secondi, e *ramping factor* lineare.

2.8 Southern-blotting e ibridazione

Il protocollo seguito prevede il trasferimento dei frammenti ottenuti mediante S1-PFGE su di una membrana di nylon (Ambion-Celbio, Milan, Italy) mediante la tecnica di trasferimento capillare.

Il gel è stato depurinato e poi denaturato per permettere la successiva ibridazione delle singole catene di DNA con la sonda marcata. Il gel era messo a contatto con la membrana e sopra veniva posizionata una pila di fogli di carta assorbente. Per ottenere il trasferimento è stato posto il tutto in un contenitore con l'apposito tampone che per capillarità attraversa il gel verso i fogli di carta assorbente consentendo il trasferimento dei frammenti di DNA alla membrana di nylon con i quali instaurano legami di natura elettrostatica. Successivamente si procedeva prima con una fase di fissaggio del DNA alla membrana di nylon mediante irradiazione UV e poi una pre-ibridazione a 50°C per 2 ore in tampone Ultra-hyb (Ultrasensitive Hybridization Buffer) (Applied Biosystems,Foster City, USA). Veniva quindi aggiunta la sonda marcata con biotina. La sonda era stata ottenuta precedentemente mediante PCR utilizzando come stampo il DNA di ceppi già caratterizzati. Gli ampliconi ottenuti erano purificati e successivamente marcati con biotina utilizzando il kit *Psoralen-Biotin BrightStar* (Ambion, ThermoFisher Scientific). Le sonde erano denaturate a 100°C per 10 minuti e messe a contatto con la membrana. Per favorire il processo di ibridazione, membrana e sonda, erano incubate overnight in leggera agitazione. Il giorno successivo la membrana veniva sottoposta a sei lavaggi in condizioni di forza ionica decrescente mediante SSC Buffer (saline-sodio citato) e SDS (laurilsolfato di sodio) al fine di rimuovere la sonda in eccesso. A questo punto si effettuava la rilevazione del segnale secondo le indicazioni del kit di marcatura. Con l'aggiunta di streptavidina il

segnale luminoso prodotto dall'interazione con la biotina poteva essere impresso su lastra fotografica. In caso di positività, la banda di ibridazione indicava la localizzazione plasmidica o cromosomica del gene.

2.9 WGS e analisi di sequenza

Dopo l'estrazione del DNA genomico con kit commerciale (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) è stato effettuato il sequenziamento mediante la piattaforma *Illumina MiSeq* (MicrobesNG, Birmingham, Regno Unito), una tecnica di nuova generazione (NGS). La peculiarità di questa piattaforma è la possibilità di ottenere le sequenze di entrambe le estremità dei frammenti ottenuti (*paired-end sequencing*), rendendo molto più accurata e specifica l'analisi bioinformatica dei dati. L'approccio utilizzato prevedeva letture *paired-end* di lunghezza 2 x 250 pb. Fase successiva al sequenziamento *Illumina* è stata quella di riassemblare le *reads* (copie complementari di ciascun frammento di DNA ottenuto) con SPAdes (*St. Petersburg genome assembler*) versione 3.11.1 (http://cab.spbu.ru/software/spades/), programma bioinformatico per la generazione di *contig* (insieme di segmenti di DNA sovrapposti).

Per ricavare informazioni sulle ORF (*open reading frame*), di lunghezza minima di 50 è stato impiegato il server di annotazione RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (http: // rast.nmpdr.org) insieme a l'ORF *Finder* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder). La qualità dei *contigs* finali è stata migliorata con *Burrows – Wheeler Aligner*. Gli spazi vuoti o *gap* tra i *contig* di plasmidi sono stati risolti dalla mappatura PCR usando primer mirati a regioni di DNA uniche e grazie al

sequenziamento *Sanger* degli ampliconi risultanti, dopo purificazione con un kit GenElute PCR Cleanup (Sigma-Aldrich). Le sequenze nucleotidiche sono state confrontate con le sequenze nel database *GenBank* usando BLASTN.

3. RISULTATI

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

Complessivamente sono stati analizzati sei campioni e tutti sono risultati positivi per la presenza di enterococchi resistenti al florfenicolo e cloramfenicolo.

Da ogni piastra di Slanetz Bartley con florfenicolo (10 mg/L) è stata prelevata una singola colonia enterococcica, complessivamente sei, sottoposta a PCR per valutare la presenza di determinanti di resistenza agli oxazolidinoni (*cfr, optrA* e *poxtA*). I prodotti di PCR ottenuti sono stati poi sottoposti al sequenziamento Sanger.

Tutti e 6 gli enterococchi florfenicolo-resistenti – 1 *E. faecalis*, 3 *E. faecium* e 2 *E. hirae*, portavano geni di linezolid-resistenza (Tabella 3). Il gene *poxtA* è presente in quasi tutti gli enterococchi analizzati, 5/6 (3 *E. faecium* e 2 *E. hirae*). *optrA* è stato osservato solo in *E. faecalis*, mentre il gene *cfr* non è stato rilevato in nessuno degli enterococchi testati. Non sono state riscontrate mutazioni puntiformi a livello del rRNA 23S o delle proteine ribosomiali.

L'identificazione dei ceppi che trasportano geni di resistenza agli oxazolidinoni è stata confermata mediante MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux).

Tutti gli isolati, inoltre, sono stati caratterizzati fenotipicamente mediante determinazione della MIC di florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid, tedizolid e tetraciclina (Tabella 3). I

campioni hanno mostrato sensibilità o resistenza al linezolid (range MIC, 2-8 mg/L) e tedizolid (range MIC, 2-4 mg/L) e resistenza al florfenicolo (range MIC, 32-128 mg/L), cloramfenicolo (range MIC, 16-128 mg/L) e tetraciclina (range MIC, 128-> 128 mg/L).

Isolato	Specie	Sito di campionamento	Campione	Geni di resistenza agli oxazolidinoni			MIC (mg/L)				
				optrA	*cfr*	*poxtA*	FFC	CHL	LZD	TZD	TE
EN3	*E. faecalis*	EN	sedimento	+	-	-	128	128	4	4	128
EF3	*E. faecium*	EF	sedimento	-	-	+	64	16	8	2	128
ES2	*E. faecium*	ES	sedimento	-	-	+	32	16	8	2	128
TF3	*E. faecium*	TF	sedimento	-	-	+	64	32	2	2	>128
GE5	*E. hirae*	GEN	sedimento	-	-	+	64	64	4	2	128
GE2	*E. hirae*	GES	zooplancton	-	-	+	64	64	8	3	128

Tabella 3. Genotipo e fenotipo dei sei enterococchi che possiedono almeno un gene di resistenza agli oxazolidinoni. FFC, florfenicolo; CHL, cloramfenicolo; LZD, linezolid; TZD, tedizolid; TE tetraciclina.

3.2 Tipizzazione degli isolati mediante SmaI-PFGE

Gli isolati enterococchi sono stati sottoposti a tipizzazione mediante SmaI-PFGE. I pulsotipi ottenuti sono stati confrontati tenendo conto del numero e della dimensione delle bande sul gel. Sono stati identificati tre diversi pulsotipi (da A a C) e due sottotipi (A1 e C1) (Tabella 4). È stato osservato che *E. faecium* EF3 ed *E. faecium* ES2 sono strettamente correlati (C e C1 rispettivamente) (Figura 24), così come *E. hirae* GE5 (dal sedimento) ed *E. hirae* GE2 (dallo zooplancton) (A1 e A rispettivamente) (Figura 23).

Isolato	**Specie**	**Campione**	**Tipizzazione**	
			SmaI-PFGE	MLST
EN3	*E. faecalis*	sedimento	-	ST585
EF3	*E. faecium*	sedimento	C	ST1710
ES2	*E. faecium*	sedimento	C_1	ST1710
TF3	*E. faecium*	sedimento	B	ST1711
GE5	*E. hirae*	sedimento	A_1	-
GE2	*E. hirae*	zooplancton	A	-

Tabella 4. Tipizzazione mediante SmaI-PFGE e MLST dei sei isolati enterococchi.

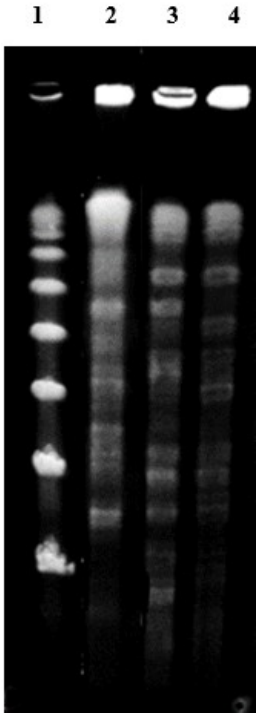

Figura 23. SmaI-PFGE.

1, Mk Lambda; 2, E. faecalis EN3; 3, E. hirae GE5; 4, E. hirae GE2.

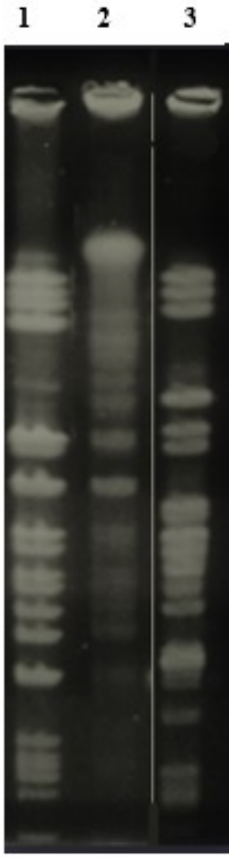

Figura 24. SmaI-PFGE.

1, E. faecium EF3; 2, E. faecium ES2; 3, E. faecium TF3.

Dalla tipizzazione mediante MLST (*Multi Locus Sequence Type*) è emerso che *E. faecalis* EN3, appartiene alla ST585, che è stata associata in precedenza ad enterococchi clinici. *E. faecium* EF3 ed *E. faecium* ES2 appartengono, invece, alla stessa ST1710. Ad *E. faecium* TF3 è stata assegnata la ST1711. Sebbene entrambe queste ST, ST1710 e ST1711, non siano mai state descritte prima, ST1710 è parte del complesso clonale CC94, che include enterococchi umani, isolati sia in ambito comunitario che ospedaliero.

3.3 Localizzazione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni e rilevamento di forme circolari

Gli esperimenti di S1-PFGE, Southern blot e ibridazione hanno consentito di chiarire la localizzazione dei determinanti di resistenza nei 6 enterococchi oggetto di questo studio (Tabella 5).

Isolato	Specie	Campione	Geni di resistenza agli oxazolidinoni			Localizzazione genica	
			optrA	*cfr*	*poxtA*	*optrA*	*poxtA*
EN3	*E. faecalis*	sedimento	+	-	-	20,140 kb	-
EF3	*E. faecium*	sedimento	-	-	+	-	chr, 30 kb
ES2	*E. faecium*	sedimento	-	-	+	-	chr, 15 e 30 kb
TF3	*E. faecium*	sedimento	-	-	+	-	chr, 30, 50 e 80 kb
GE5	*E. hirae*	sedimento	-	-	+	-	25 e 100 kb
GE2	*E. hirae*	zooplancton	-	-	+	-	25 e 100 kb

Tabella 5. Localizzazione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni. chr: localizzazione cromosomica.

In *E. faecalis* EN3, il gene *optrA* era localizzato su plasmidi di circa 20 e 140 kb (Figura 25); mentre nei tre isolati di *E. faecium poxtA*-positivi il gene era presente sia a livello cromosomico che plasmidico. Il gene *poxtA* risultava, infatti, localizzato su plasmidi di diverse dimensioni: di circa 30 kb in *E. faecium* EF3, circa 15 e 30 kb in *E. faecium* ES2 e circa 30, 50 e 80 kb in *E. faecium* TF3 (Figura 26). Nei due isolati strettamente correlati, *E. hirae* GE5 ed *E. hirae* GE2, la sonda specifica per *poxtA* non ibridizzava sul cromosoma ma dava segnale positivo su plasmidi di circa 25 e 100 kb (Figura 27).

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

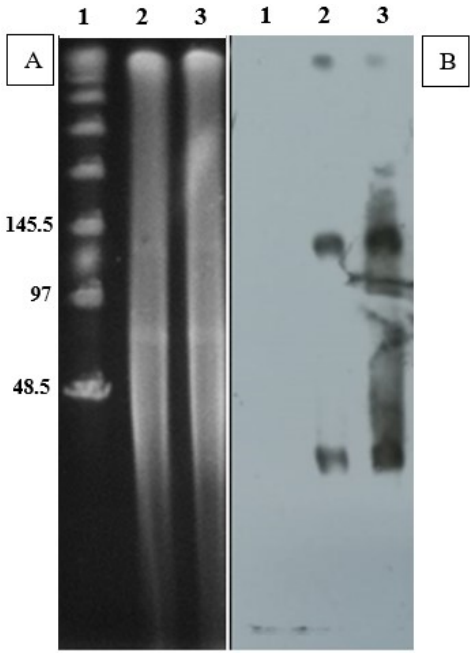

Figura 25. A) S1-PFGE e B) ibridazione con la sonda specifica per il gene optrA.

(1) M1; (2) E. faecalis EN2; (3) E. faecalis EN3.

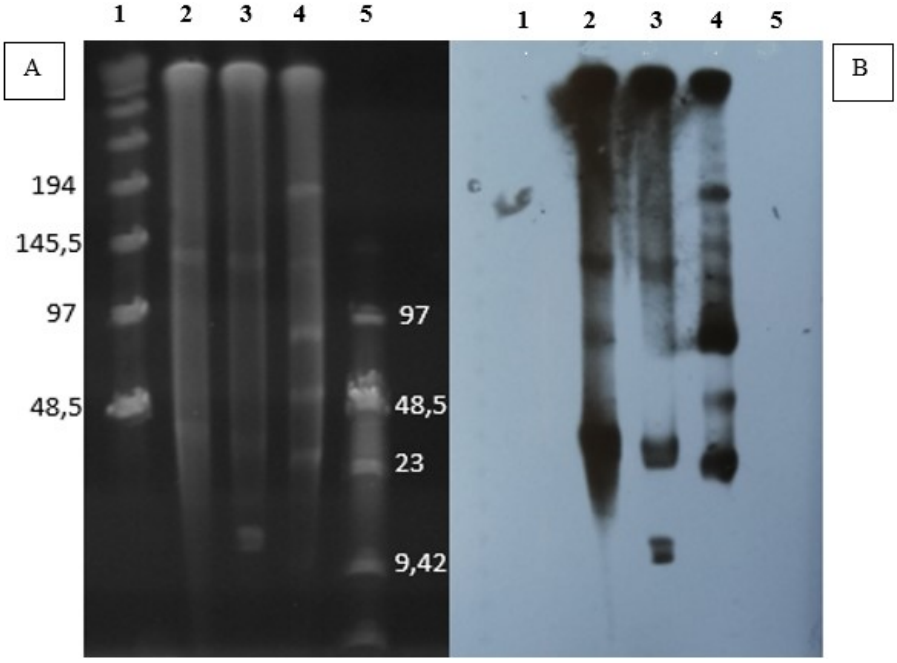

Figura 26. A) S1-PFGE e B) ibridazione con la sonda specifica per il gene poxtA.

(1) M1; (2) E. faecium EF3; (3) E. faecium ES2; (4) E. faecium TF3; (5) M2.

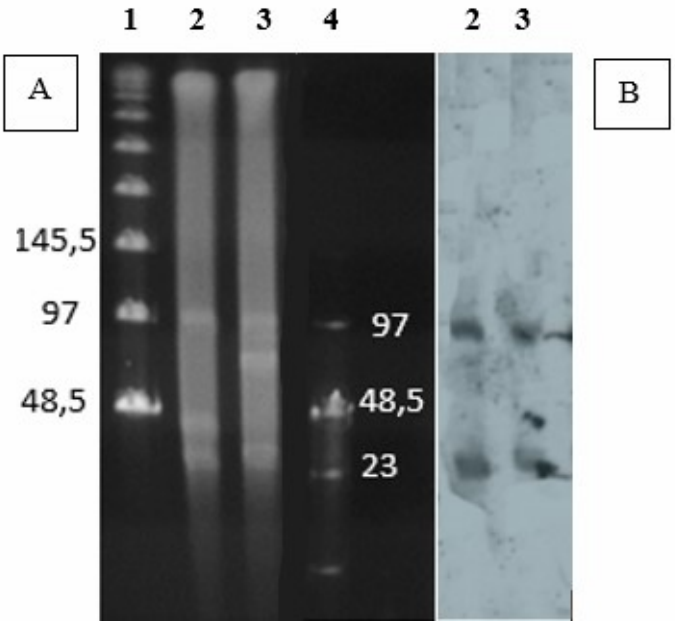

Figura 27. A) S1-PFGE e B) ibridazione con la sonda specifica per il gene poxtA:

(1) M1; (2) E. faecium GE5; (3) E. faecium GE2; (4) M2.

La capacità dei diversi contesti genetici di escindersi in forma circolare è stata valutata mediante esperimenti di PCR. Per quanto riguarda il contesto genetico di *optrA*, non è stata riscontrata nessuna forma circolare. Dal momento che l'ibridazione ha luogo su plasmidi di diverse dimensioni (~ 20 kb e ~ 140 kb), non possiamo escludere la presenza di una doppia copia del gene *optrA* in *E. faecalis* EN3 o che si verifichino eventi di ricombinazione tra i plasmidi.

Al contrario, i contesti genetici di *poxtA* sembrano in grado di formare minicircoli; ciò avvalora l'ipotesi di un'elevata capacità di diffusione orizzontale del gene. In di *E. faecium*, l'ibridazione si verifica, infatti, sia su plasmidi di diverse dimensioni che sul cromosoma. La mobilità intracellulare è favorita dalla presenza di elementi IS funzionali ad eventi di ricombinazione.

3.4 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni.

La trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni è stata studiata attraverso esperimenti di coniugazione su filtro utilizzando come donatori i sei ceppi risultati positivi per la presenza di geni di resistenza al linezolid e come ricevente *E. faecium* 64/3. Cinque isolati erano in grado di trasferire i geni di linezolid-resistenza in incroci intra e interspecifici a frequenze da 1,1 x 10^{-1} a 3 x 10^{-6} CFU per ricevente. Le frequenze più elevate sono state osservate nel trasferimento intraspecifico di *poxtA* da *E. faecium* ES2 ed *E. faecium* TF3 a *E. faecium* 64/3 (6.5 x 10^{-1} CFU e 1.1 x 10^{-1} CFU rispettivamente). Nonostante diversi tentativi, *E. faecalis* EN3 non è stato in grado di trasferire il gene *optrA* al ricevente di *E. faecium* 64/3. Per ciascun incrocio sono stati selezionati e caratterizzati

due transconiuganti. In ciascuno di essi, l'acquisizione del gene di resistenza è stata confermata mediante PCR e attraverso la valutazione del fenotipo di resistenza tramite determinazione delle MIC (Tabella 6). I transconiuganti sono stati, inoltre, sottoposti a SmaI-PFGE per confermare il loro background genetico.

Infine, nonostante la capacità di trasferimento di *poxtA* da *E. hirae* a *E. faecium* 64/3 non sia risultata particolarmente elevata (7.5×10^{-5} CFU per *E. hirae* GE5 e 3×10^{-6} CFU per *E. hirae* GE2), il dato è importante perché suggerisce che questa specie enterococcica possa rappresentare un *reservoir* di geni di linezolid-resistenza potenzialmente trasferibili ad *E. faecium*.

Donatori				Ricevente	Frequenza di trasferimento[1]	Transconiuganti		
	MIC (mg/L)		Genotipo LZD-R			MIC (mg/L)		Genotipo LZD-R
	FFC	LZD				FFC	LZD	
E. faecalis EN3	128	4	*optrA*	*E. faecium 64/3*	NR[a]	-	-	-
E. faecium EF3	64	8	*poxtA*	*E. faecium 64/3*	5×10^{-5}	64	4	*poxtA*
E. faecium ES2	32	8	*poxtA*	*E. faecium 64/3*	6.5×10^{-1}	64	4	*poxtA*
E. faecium TF3	64	2	*poxtA*	*E. faecium 64/3*	1.1×10^{-1}	32	2	*poxtA*
E. hirae GE5	64	4	*poxtA*	*E. faecium 64/3*	7.5×10^{-5}	64	4	*poxtA*
E. hirae GE2	64	8	*poxtA*	*E. faecium 64/3*	3×10^{-6}	64	4	*poxtA*

Tabella 6. Trasferimento coniugativo dei geni di resistenza agli oxazolidinoni ad E. faecium 64/3.

[1]La frequenza di trasferimento è stata espressa come CFU di transconiugante/ricevente. FFC, florfenicolo; LZD, linezolid.

[a] Frequenza di trasferimento non rilevabile alle condizioni sperimentali utilizzate

3.5 WGS analisi

L'analisi WGS, eseguita sui sei enterococchi, ha consentito di acquisire la sequenza e definire l'organizzazione di tre plasmidi che portano geni di resistenza al linezolid (Figure 28-30).

L'analisi bioinformatica del genoma di *E. faecalis* EN3, unita alla PCR mapping e al sequenziamento Sanger, ha dimostrato che *optrA* è localizzato su un plasmide di 16.500 bp, chiamato pEfs-EN3 (contenuto di G + C relativamente basso pari al 33,0%) (*GenBank accession number* MT683614). Secondo la nomenclatura delle varianti *optrA* riportata da Morroni *et al.* [56], *E. faecalis* EN3 possiede la variante *optrA* DP già rilevata in diversi cloni di *E. faecalis* di origine umana e animale. Il contesto genetico di *optrA* (6.810 bp), fiancheggiato da due IS*1216* disposte nello stesso orientamento, conteneva anche il gene *fexA* situato 687 bp a monte di *optrA* (Figura 28). Un'organizzazione simile è stata precedentemente descritta in plasmidi di *E. faecalis* isolati da cani in Cina [57]. È stata anche rilevata la presenza dei geni *repA*, *parA* e *prgN* (*orf8*, *orf10* e *orf11* rispettivamente) responsabili della replicazione e del partizionamento dei plasmidi. Il plasmide pEfs-EN3 appartiene alla famiglia RepA_N e porta il gene *rep9*, caratteristica tipica di plasmidi di *E. faecalis* feromone-indotti [58].

Per quanto riguarda gli isolati di *E. faecium*, dal momento che i tre isolati condividevano un plasmide *poxtA* di circa 30 kb si è deciso di procedere al suo assemblaggio.

In *E. faecium* EF3, il gene *poxtA* era localizzato su un plasmide 27.703 bp denominato pEfm-EF3 (contenuto di G + C del 35,0%) (*GenBank accession number* MT683615). Il contesto genetico di *poxtA* (4.003 bp), fiancheggiato da due IS*1216* nello stesso

orientamento, era a sua volta inserito in un trasposone Tn*6657-like* contenente anche *fexB* come originariamente descritto in MRSA AOUC-0915 (*GenBank accession number* MF095097) [51]. A monte di Tn*6657* era presente una regione di resistenza alla tetraciclina contenete i geni *tet*(L) e *tet*(M) disposti in tandem; a valle, invece, trovavamo i quattro geni presenti in Tn*6657* (*orf28-orf31*) e coinvolti nel partizionamento e nella replicazione dei plasmidi (Figura 29). pEfm-EF3 ha mostrato un'identità del DNA del 99% (copertura del 100%) con regioni di pC25-1 e pC27-2, due plasmidi Inc18 ad ampio spettro d'ospite presenti in un ceppo *E. faecium* di origine suina (CC17) isolato in Cina (*GenBank accession number* MH784601 e MH784602, rispettivamente).

E. faecium ES2 ed *E. faecium* TF3, possedevano plasmidi portatori di *poxtA* identici a pEfm-EF3. È interessante notare che i tre isolati di *E. faecium* sono stati isolati da diversi siti di campionamento (Figura 22).

L'analisi WGS in *E. hirae* GE2 ha confermato la presenza del gene *poxtA*, localizzato su un plasmide di 24.793 bp, denominato pEh-GE2 (contenuto G + C del 38,0%) (*GenBank accession number* MT683616). L'analisi BLASTN ha evidenziato la presenza in pEh-GE2 di due regioni che mostrano elevata identità con elementi genetici noti. Una regione di 12,8 kb contenente il caratteristico contesto genetico *poxtA* (da *orf1* a *orf18*) presentava un'identità del 99% con il trasposone Tn*6657-like* (Figura 30). Il gene *poxtA* era fiancheggiato da due IS*1216* come osservato in pEfs-EN3 (Figura 28). La seconda regione di 14,7 kb (da *orf19* a *orf31*) contenente la regione di coniugazione di Tn*916* (incluso il gene *rep*) mostrava anch'essa un'identità del 99% con il plasmide di *E. faecium* E4457 (*GenBank accession number* LR135260) (Figura 30). pEh-GE2 è risultato appartenere alla

famiglia Rep_trans, che include plasmidi di piccole dimensioni ampiamente diffusi tra gli enterococchi.

E. hirae GE5 mostrava un plasmide *poxtA* con una completa sintenia con il pEh-GE2, nonostante i due ceppi siano stati isolati da sedimento e da zooplancton (Tabella 4).

È interessante notare che i plasmidi *poxtA* di *E. hirae* e di *E. faecium* condividevano la regione Tn*6657-like* (coverage 55%, identità del 99%) suggerendo una diffusione di questo elemento negli enterococchi.

I risultati dell'ibridazione hanno mostrato la presenza anche di plasmidi *optrA* e *poxtA* di dimensioni maggiori: (140 kb in *E. faecalis* EN3 e 100 kb in *E. hirae* GE2 ed *E. hirae* GE5) che, tuttavia, non sono stati ancora assemblati.

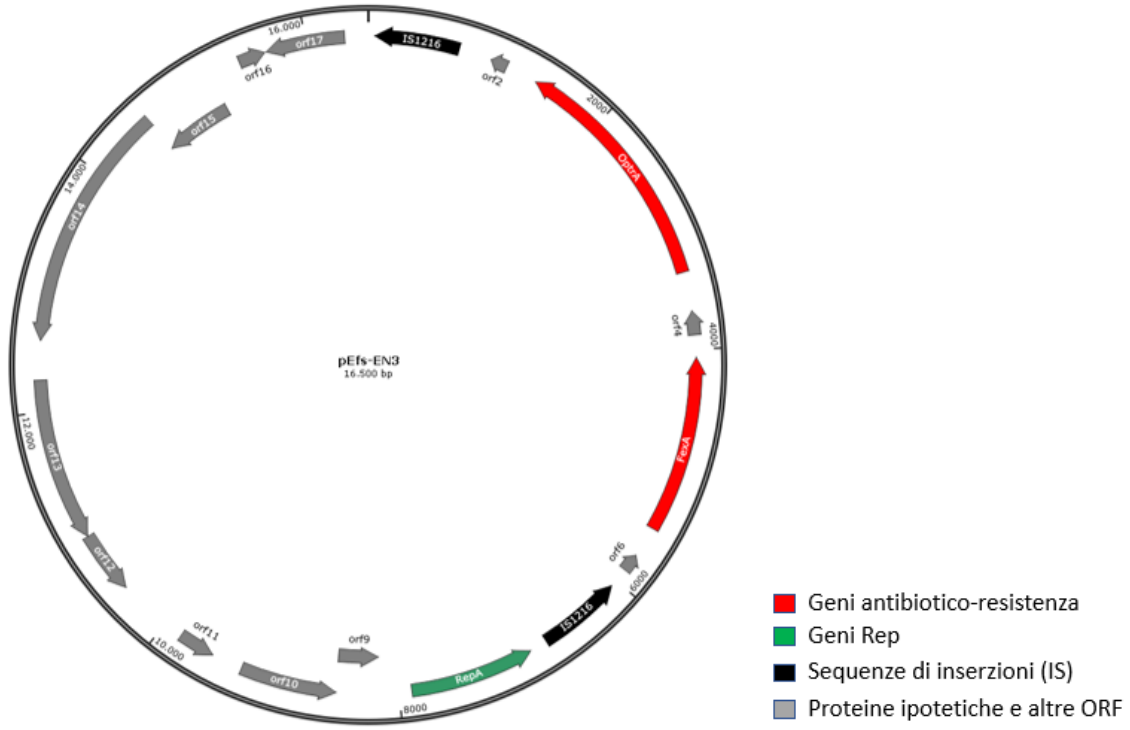

Figura 28. Rappresentazione schematica del plasmide pEfs-EN3 (16.500 bp) di E. faecalis EN3 (numero di accesso MT683614).

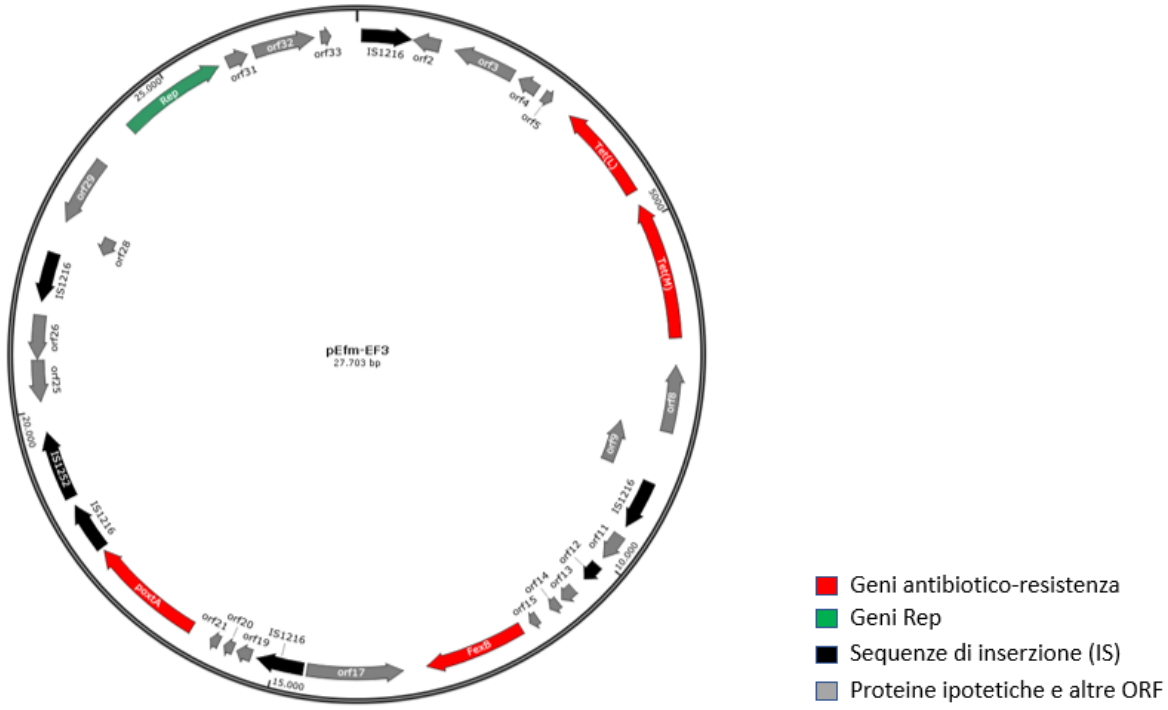

Figura 29. Rappresentazione schematica del plasmide pEfm-EF3 (27.703 bp) di E. faecium EF3 (numero di accesso MT683615).

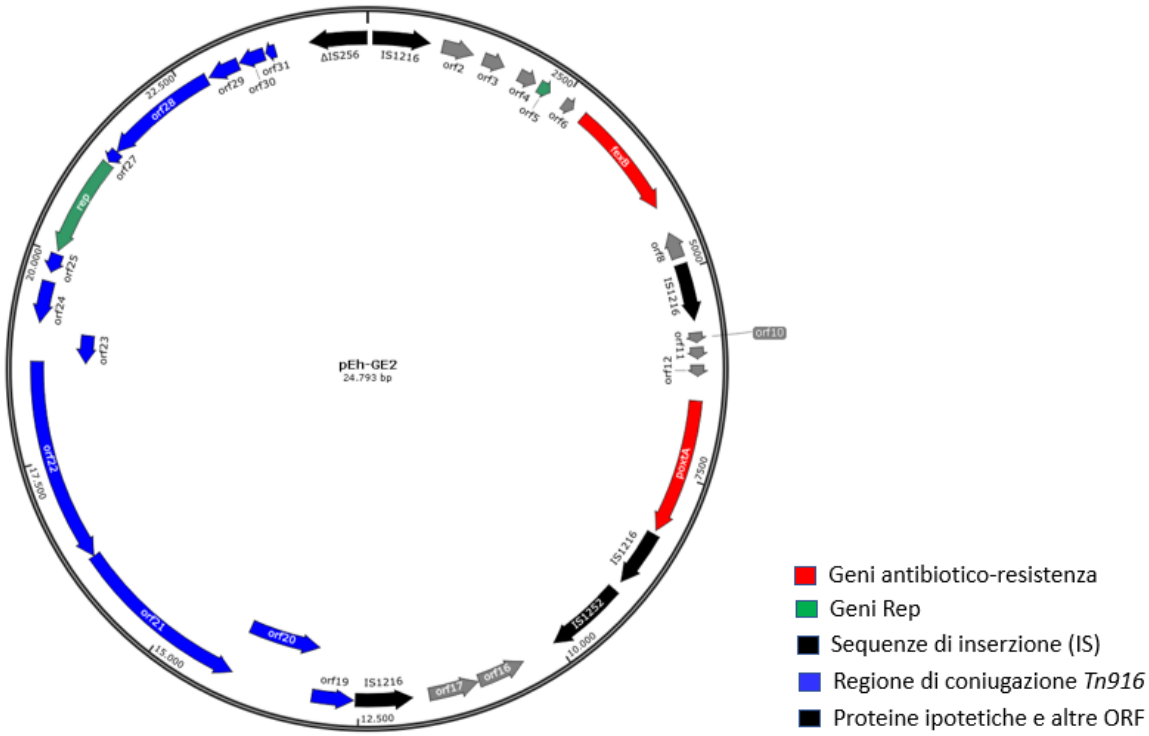

Figura 30. Rappresentazione schematica del plasmide pEh-GE2 (24.793 bp) di E. hirae GE2 (numero di accesso MT683616).

4. DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni il problema legato alla diffusione delle antibiotico-resistenze è emerso drammaticamente a livello globale e registra una continua crescita. In tutto il mondo giornalmente vengono segnalati ceppi batterici che hanno sviluppato resistenza o acquisito determinanti di resistenza agli antibiotici attualmente in uso.

Il fenomeno, drammatico in clinica umana, non è tuttavia limitato a ceppi di origine umana, ma riguarda anche ceppi di origine animale. In modo particolare gli allevamenti intensivi, a causa dell'eccessivo impiego di antibiotici, sono divenuti importanti *reservoir* di geni di antibiotico-resistenza potenzialmente trasferibili ai patogeni umani attraverso la catena alimentare.

Anche se gli antibiotici ad uso veterinario non sono gli stessi impiegati in clinica umana essi, tuttavia, appartengono spesso alla stessa classe o comunque sono in grado, attraverso meccanismi di co-selezione, di promuovere il trasferimento anche di geni di resistenza a farmaci ad uso esclusivamente umano.

I fenicoli, ad esempio, sono farmaci ad esclusivo uso veterinario ampiamente utilizzati in zootecnia per prevenire o curare infezioni enteriche e respiratorie negli animali. Tuttavia, la pressione selettiva da essi esercitata è in grado di favorire la diffusione non solo dei geni di resistenza ai fenicoli ma anche, mediante meccanismi di co-selezione, di geni di resistenza ad altri farmaci tra cui gli oxazolidinoni. Questa nuova classe antibiotica comprende antibiotici ad esclusivo utilizzo umano; linezolid e tedizolid sono impiegati come farmaci *last-resort* in ambito ospedaliero nel trattamento di gravi infezioni sostenute da batteri Gram-positivi inclusi MRSA, VRE, pneumococchi e micobatteri MDR.

I fenicoli, inoltre, dopo essere stati eliminati dagli animali trattati, rimangono attivi nel suolo e sono in grado di esercitare una pressione selettiva anche sui batteri ambientali.

È ormai evidente che i geni di antibiotico-resistenza sono ubiquitari. L'OMS, l'Unione Europea e molti Ministeri Nazionali hanno promosso numerose iniziative che hanno come comune obiettivo quello di prevenire e contenere la diffusione dell'AMR, ma anche di sensibilizzare la società ad un uso più razionale di questi farmaci.

La grave "crisi antibiotica" che stiamo vivendo, dovuta alla carenza di molecole ancora attive e al mancato sviluppo di nuovi farmaci da parte delle industrie farmaceutiche, ci impone di preservare ad ogni costo le poche risorse ancora in nostro possesso.

Di fatto, il problema dell'antibiotico-resistenza non ha risparmiato neanche gli oxazolidinoni. La natura sintetica di questi farmaci aveva indotto a ritenere che fenomeni di resistenza sarebbero comparsi con grande difficoltà. Ma sin dalle prime applicazioni, ceppi resistenti al linezolid sono stati segnalati sia in ambito clinico che animale. I principali meccanismi di resistenza sono riconducibili alla comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22, e all'acquisizione di determinanti di resistenza trasferibili (*cfr, cfr*(B), *cfr*(C), *cfr*(D), *optrA* e *poxtA*).

L'ambiente marino è caratterizzato da una comunità microbica molto complessa di cui fanno parte anche batteri transitori derivanti dell'inquinamento antropico causato in modo particolare dalle reti fognarie ospedaliere e domestiche e dagli allevamenti. Tra i batteri transienti spesso rileviamo gli enterococchi, membri del microbiota intestinale dell'uomo e degli animali. Questi microrganismi dimostrano una particolare propensione ad acquisire

materiale genetico mediante HGT con un vantaggio in termini di fitness soprattutto in presenza di una pressione selettiva antibiotica. Gli enterococchi sono rilasciati in grandi quantità con le feci nell'ambiente e possono, pertanto, essere isolati da diverse fonti tra cui suolo, alimenti di origine animale e vegetale e corsi d'acqua.

Oltre che normali commensali, gli enterococchi sono importanti patogeni nosocomiali e la comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza in questo genere batterico è motivo di grave preoccupazione. L'acquisizione di geni di resistenza sta considerevolmente limitando le opzioni terapeutiche per il trattamento di infezioni enterococciche; negli ultimi decenni sono state riportate in numero crescente resistenze nei confronti di penicillina/ampicillina, aminoglicosidi e glicopeptidi, mentre ceppi linezolid-resistenti hanno, per il momento, una bassa incidenza.

Lo scopo di questo studio è stato quello di monitorare la presenza di geni di linezolid-resistenza in enterococchi isolati da campioni di zooplancton e di sedimento raccolti in due distinte aree costiere italiane nel Mar Ligure e nel Mar Adriatico.

Dopo un iniziale screening sono stati selezionati sei enterococchi florfenicolo-resistenti saggiati mediante PCR per la presenza di geni di resistenza al linezolid (*cfr*, *optrA* e *poxtA*). Tutti e sei gli isolati sono risultati positivi per la presenza di geni di linezolid-resistenza. Il gene *poxtA* era il più diffuso (5/6 isolati), mentre il gene *cfr* era assente. Un *E. faecalis* possedeva, invece, il gene *optrA*.

Il gene *poxtA,* descritto per la prima volta in un MRSA isolato da un paziente con fibrosi cistica [52], è stato riscontrato successivamente in numerosi enterococchi di origine animale. La rapida diffusione di *poxtA* può in parte essere riconducibile alla capacità del

suo contesto genetico di escindersi in forma circolare. Anche la pressione selettiva operata dall'ampio utilizzo in medicina veterinaria di fenicoli e tetracicline, può aver contribuito alla sua diffusione in ambito animale. Non è da sottovalutare inoltre la possibilità che ceppi *poxtA*-positivi presenti nel letame, principale fertilizzante utilizzato nelle produzioni biologiche, possano aver contaminato vegetali o acque di irrigazione.

La presenza di enterococchi linezolid-resistenti in campioni marini costieri, mai documentata ad oggi, è certamente motivo di grave preoccupazione. Da questo studio emerge la capacità di gran parte di questi ceppi di trasferire i determinanti di resistenza agli oxazolidinoni a riceventi sensibili con frequenze complessivamente elevate. Questo dato è in linea con la localizzazione prevalentemente plasmidica dei geni emersa dagli esperimenti di S1-PFGE e di ibridazione.

Anche se con bassa frequenza gli isolati di *E. hirae* si sono dimostrati in grado di trasferire *poxtA* ad *E. faecium* ricevente. Ceppi *poxtA*-positivi appartenenti a questa specie enterococcica sono stati precedentemente isolati da animali trattati con fenicoli. Questi dati sottolineano pertanto la propensione di specie scarsamente rilevanti per l'uomo di trasferire in incroci interspecifici geni di linezolid-resistenza ad enterococchi patogeni per l'uomo.

La localizzazione plasmidica dei geni di resistenza è stata confermata, poi, dall'analisi WGS dei genomi. L'analisi ha mostrato che il gene *optrA* fa parte di un plasmide pEfs-EN3 (16,5 kb), mentre *poxtA* è localizzato su un elemento mobile Tn*6657-like* integrato su due plasmidi di dimensioni simili: pEfm-EF3 (27,7 kb) e pEh-GE2 (24,8 kb).

Tn*6657-like* presente in pEFm-EF3 di *E. faecium* e in pEh-GE2 di *E. hirae* risulta delimitato da sequenze di inserzione del tipo IS*1216* funzionali ad eventi di ricombinazione.

L'organizzazione di pEFs-EN3, pEFm-EF3 e pEh-GE2 è simile a quella di plasmidi precedentemente descritti in ceppi di origine animale, suggerendo che un flusso di geni, dal serbatoio animale a quello acquatico, possa aver avuto luogo. Il contesto genetico di *optrA* in pEFs-EN3, infatti, è risultato simile a quello presente in plasmidi di *E. faecalis* isolati da cani in Cina [57]. pEfm-EF3 ha mostrato un'identità del DNA del 99% con regioni di pC25-1 e pC27-2, due plasmidi Inc18 ad ampio spettro d'ospite presenti in un ceppo *E. faecium* di origine suina (CC17) [Haung et *al*., 2019]. Infine, pEh-GE2, oltre a Tn*6657-like* presentava anche una regione di coniugazione di Tn*916* che mostrava un'identità del 99% con il plasmide di *E. faecium* E4457.

Questo studio è il primo a documentare la presenza di geni di linezolid-resistenza in enterococchi isolati dall'ambiente marino; i risultati in parte riconducibili a inadeguati impianti di trattamento delle acque reflue immesse in mare, destano grave preoccupazione per la possibile trasmissione della resistenza a patogeni umani con gravi conseguenze per la salute dell'uomo.

Studi condotti nel 2016 su tre diversi impianti di depurazione del Nord Italia hanno evidenziato che i sistemi di depurazione delle acque sono progettati per eliminare efficacemente una serie di inquinanti di natura chimica e microbiologica (fosforo, metalli, batteri di origine fecale) ma per i nuovi microinquinanti, rilasciati nei reflui urbani, non ci sono ancora processi specifici di smaltimento [59].

Occorre, pertanto, implementare le pratiche volte a limitare la diffusione di ceppi linezolid-resistenti anche in ambiente marino. È ormai chiaro che solo attraverso un attento monitoraggio del resistoma ambientale sarà possibile preservare l'efficacia di farmaci *last-resort* come gli oxazolidinoni. Un efficace controllo, dunque, delle antibiotico-resistenze non può più prescindere da un approccio integrato che preveda un sinergismo tra gli interventi in campo veterinario, medico e ambientale.

Bibliografia

1. World Health Organization. Accessed on 25 June 2019.Antimicrobial Resistance. Available online: https://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.
2. Sadowy E, Luczkiewicz A. Drug-resistant and hospital-associated Enterococcus faecium from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. *BMC Microbiol*. 2014; 14:66. Published 2014 Mar 14. doi: 10.1186/1471-2180-14-66
3. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56-66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
4. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)2018.
5. Fouz N, Pangesti KNA, Yasir M, et al. The Contribution of Wastewater to the Transmission of Antimicrobial Resistance in the Environment: Implications of Mass Gathering Settings. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(1):33. Published 2020 Feb 25. doi:10.3390/tropicalmed5010033
6. Werner G, Coque TM, Franz C, et al. Antibiotic resistant enterococci—tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol*. 2013;303: 360–79.

7. Brickner, S.J. *et al*. 1996. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrugresistant gram-positive bacterial infections. *J. Med. Chem.***39:** 673–679.
8. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2011; 1241:48-70.
9. Zhanel GG, Love R, Adam H, et al. Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs*. 2015; 75(3):253-70.
10. Daniel N. Wilson, Frank Schluenzen, Joerg M. Harms, Agata L. Starosta, Sean R. Connell, Paola Fucini. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Sep 2008, 105 (36) 13339-13344; DOI: 10.1073/pnas.0804276105.
11. Steven J. Brickner, Douglas K. Hutchinson, Michael R. Barbachyn, Peter R. Manninen, Debra A. Ulanowicz, Stuart A. Garmon, Kevin C. Grega, Susan K. Hendges, Dana S. Toops, Charles W. Ford, and Gary E. Zurenko. Synthesis and Antibacterial Activity of U-100592 and U-100766, Two Oxazolidinone Antibacterial Agents for the Potential Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Positive Bacterial Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*,1996.
12. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):603-612. doi:10.1128/AAC.05702-11.

13. Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS. 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol*. 294:93–101.
14. Pfizer. 2010. Zyvox R (linezolid) package insert. Available at: http://www.pfizer.com/files/products/uspi zyvox.pdf. Accessed October 28, 2011.
15. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018; 12 1759–1767.
16. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2014; 17(1-2):1-12.
17. Schaadt, R. et al. 2009. The in vitro activity of TR-700, the active ingredient of the antibacterial prodrug TR-701, a novel oxazolidinone antibacterial agent. *Antimicrob. Agents Chemother*. 53: 3236–3239.
18. Shaw, K.J. et al. 2008. In vitro activity of TR-700, the antibacterialmoiety of the prodrugTR-701, against linezolidresistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52: 4442–4447.
19. Rybak, J.M., & Roberts, K.D. (2015). Tedizolid Phosphate: a Next-Generation Oxazolidinone. *Infectious Diseases and Therapy, 4*, 1 - 14.
20. Shinabarger, D. 1999. Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* 8: 1195–1202.
21. Ballow CH, Jones RN, Biedenbach DJ. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002b; 43: 75–83.

22. Bolmstrom A, Ballow CH, Qwarnstrom A, Biedenbach DJ, Jones RN. Multicentre assessment of linezolid antimicrobial activity and spectrum in Europe: report from the Zyvox antimicrobial potency study (ZAPS-Europe). *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 791–800.

23. Gales AC, Sader HS, Andrade SS, Lutz L, Machado A, Barth AL. Emergence of linezolid-resistant Staphylococcus aureus during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 300– 302.

24. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 2004; 39; 1010–1015.

25. Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell DJ, Robbins M. Linezolid resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 186–188.

26. Marshall, S.H. et al. 2002. Gene dosage and linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46: 3334–3336.

27. Billal DS, Feng J, Leprohon P, Legare D, Ouellette M. 2011. Whole genome analysis of linezolid resistance in Streptococcus pneumoniae reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics* 12:512.

28. Bosling J, Poulsen SM, Vester B, Long KS. 2003. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47:2892–2896.

29. Kehrenberg C, Schwarz S. 2006. Distribution of florfenicol resistance genes fexA and cfr among chloramphenicol-resistant Staphylococcus isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 50:1156 –1163.

30. Singh KV, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Tedizolid against Enterococci and Staphylococci, Including cfr+ Strains, in a Mouse Peritonitis Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63:e02627-18. doi:10.1128/AAC.02627-18

31. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:2500 –2505.

32. Shen J, Wang Y, Schwarz S, *et al*. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(8):1697-706.

33. Wang Y, Li D, Song L, *et al*. First report of the multiresistance gene *cfr* in Streptococcus suis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8):4061-4063. DOI: 10.1128/AAC.00713-13.

34. Liu Y, Wang Y, Wu C, et al. First report of the multidrug resistance gene cfr in Enterococcus faecalis of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(3):1650-4.

35. Jennifer K. Bender, Carola Fleige, Ingo Klare, Stefan Fiedler, Alexander Mischnik, Nico T. Mutters, Kate E. Dingle, Guido Werner Detection of a cfr(B) Variant in German Enterococcus faecium Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in Enterococcus spp. PLoS One. 2016; 11(11): e0167042. Published online 2016 Nov 28. doi: 10.1371/journal.pone.0167042

36. Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, *et al*. Detection of a New cfr-Like Gene, *cfr*(B), in Enterococcus faecium Isolates Recovered from Human Specimens in the

United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(10):6256-61.

37. Marin M, Martin A, Alcala L, Cercenado E, Iglesias C, Reigadas E, et al. Clostridium difficile isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene cfr. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (1):586±9. doi: 10.1128/AAC.04082-14 PMID: 25385106.
38. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH, Wolffs PF. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2013; 4:87. doi: 10.3389/fmicb.2013.00087 PMID: 23616784.
39. Yizhi Tang, Lei Dai, Orhan Sahin, Zuowei Wu, Mingyuan Liu, Qijing Zhang, Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr*(C) in foodborne pathogen Campylobacter. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 72, Issue 6, June 2017, Pages 1581–1588, https://doi.org/10.1093/jac/dkx023
40. Guerin F, Sassi M, Dejoies L, et al. Molecular and functional analysis of the novel cfr(D) linezolid resistance gene identified in Enterococcus faecium. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(7):1699-1703. doi:10.1093/jac/dkaa125
41. Mendes RE, Hogan PA, Jones RN, *et al*. Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): evolving resistance mechanisms with stable susceptibility rates. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(7):1860-1865. DOI: 10.1093/jac/dkw052.
42. Wang Y, Lv Y, Cai J, et al. A novel gene, optrA, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(8):2182-90.

43. Cavaco, L.M., Korsgaard, H., Kaas, R.S., Seyfarth, A.M., Leekitcharoenphon, P.,Hendriksen, R.S., 2017. First detection of linezolid resistance due to the optrA gene in enterococci isolated from food products in Denmark. *J. Glob. Antimicrob. Resist*. 9,128–129.

44. Sharkey, L.K.R., O'Neill, A.J., 2018. Antibiotic resistance ABC-F proteins: bringing target protection into the limelight. *ACS Infect. Dis.* 4, 239–246.

45. Ero R, Kumar V et al. Ribosome protection by ABC-F proteins Molecular mechanism and potential drug design. *Protein Science*.2019; DOI: 10.1002/pro.3589.

46. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, et al. Detection in Italy of two clinical Enterococcus faecium isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene optrA and a silent multiresistance gene cfr. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(4): 1118-1129.

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

48. Huang, J., Chen, L., Wu, Z., Wang, L., 2017. Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of optrA in Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob Chemother*. 72, 614–616.

49. Morroni G, Brenciani A, Antonelli A, et al. Characterization of a Multiresistance Plasmid Carrying the *optrA* and *cfr* Resistance Genes From an *Enterococcus faecium* Clinical Isolate. *Front Microbiol*. 2018;9:2189. Published 2018 Sep 11. doi:10.3389/fmicb.2018.02189.

50. Schwarz, F. V., Perreten, V., and Teuber, M. (2001). Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from Enterococcus faecalis RE25 *Plasmid*.2001; 46(3):170-187. doi:10.1006/plas.2001.1544

51. Egan SA, Shore AC, O'Connell B, Brennan GI, Coleman DC. Linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes optrA and poxtA in isolates with diverse genetic backgrounds. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(7):1704-1711. doi:10.1093/jac/dkaa075

52. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, et al. Characterization of poxtA, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1763-1769. doi:10.1093/jac/dky088

53. D'Andrea MM, et al. Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying poxtA, cfr and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019; DOI:10.1093/jac/dkz278.

54. Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, *et al*. SmaI macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist*. 2001; 7(1):65-71.

55. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*. 2003;11(10):479-487. doi:10.1016/j.tim.2003.08.006]

56. Morroni G, Brenciani A, Simoni S, Vignaroli C, Mingoia M, Giovanetti E. Commentary: Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene

optrA in *Enterococcus* Isolates in China From 2004 to 2014. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1631.

57. Wu Y, Fan R, Wang Y, Lei L, Feßler AT, Wang Z *et al*. Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. *Sci Rep* 2019; **9**: 15500.
58. Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, Coque TM, Francia MV, Hayes F. Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; February 9, 2014.
59. (website) https://www.researchitaly.it/news/geni-antibiotico-resistenti-e-acque-reflue