



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

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

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia molecolare e applicata

**TRASFERIBILITÀ *IN VITRO* E *IN VIVO* DI GENI DI
ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CEPPI DI
*Enterococcus faecium***

***IN VITRO* AND *IN VIVO* TRANSFERABILITY OF
ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN
*Enterococcus faecium***

Tesi di Laurea Magistrale di

Filomena Carriera

Relatore
Chiar.mo Prof.

Carla Vignaroli

Correlatore

Serena Simoni

Sessione estiva
Anno Accademico 2023/2024

Sommario

1.INTRODUZIONE	4
1.1 Antibiotico-resistenza	4
1.1-1 Meccanismi di antibiotico-resistenza	9
1.2 Trasferimento genico orizzontale (HGT)	12
1.2-1 Coniugazione batterica.....	14
1.3 Diffusione dei geni di antibiotico-resistenza nell'ambiente	23
1.4 Indicatori di contaminazione batterica fecale (FIB)	29
1.5 Enterococcus spp.	34
1.5-1 Antibiotico-resistenza negli enterococchi.....	38
1.5-2 Enterococchi in ambiente marino e nei mitili	43
1.6 Mitili.....	45
1.6-1 Mytilus galloprovincialis	48
1.6-2 Tolleranza di M. galloprovincialis alle infezioni batteriche	49
1.6-3 Resistenza dei microrganismi all'attività battericida dell'emolinfa	51
2.SCOPO DELLA TESI.....	54
3. MATERIALI E METODI.....	56
3.1 Ceppi batterici	56
3.2 Terreni di coltura	57
3.3 Fase di depurazione dei mitili	60
3.4 Saggi di coniugazione in vivo.....	63

3.5	<i>Saggi di coniugazione in vitro in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico</i>	68
3.6	<i>Saggi di coniugazione in vivo in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico</i>	70
3.7	<i>Saggi di coniugazione in vitro in emolinfa in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico</i>	72
3.8	<i>Caratterizzazione genotipica dei ceppi transconiuganti</i>	74
3.8-1	<i>Estrazione del DNA totale batterico</i>	75
3.8-2	<i>Saggi di PCR</i>	76
3.8-3	<i>PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)</i>	79
3.8-3.1	<i>SmaI-PFGE</i>	79
3.8-3.2	<i>S1-PFGE</i>	82
3.9	<i>Caratterizzazione fenotipica dei ceppi transconiuganti tramite determinazione della MIC</i>	83
4.	RISULTATI	86
4.1	<i>Saggi di coniugazione in vivo</i>	86
4.1-1	<i>Saggi di coniugazione in vivo, condizione 1: inoculo dei ceppi in acqua</i>	86
4.1-2	<i>Saggi di coniugazione in vivo, condizione 2: iniezione dei ceppi nel muscolo adduttore dei mitili</i>	91
4.1-3	<i>Confronto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di coniugazione in vivo: inoculo dei ceppi in acqua vs iniezione nel muscolo adduttore</i>	99

<i>4.2 Saggi di coniugazione in vitro in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico</i>	<i>100</i>
<i>4.3 Saggi di coniugazione in vivo in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico</i>	<i>102</i>
<i>4.4 Saggi di coniugazione in vitro in emolinfa in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico.....</i>	<i>108</i>
<i>4.4-1 Caratterizzazione genotipica dei ceppi transconiuganti</i>	<i>112</i>
<i>4.4-2 Caratterizzazione fenotipica dei ceppi transconiuganti.....</i>	<i>116</i>
5.DISCUSSIONE.....	118
6.BIBLIOGRAFIA.....	128

1.INTRODUZIONE

1.1 Antibiotico-resistenza

Il termine “antibiotico” venne per la prima volta utilizzato nel 1941 da Selman Waksman per descrivere delle piccole molecole prodotte dai microbi in grado di inibire la crescita di altri microrganismi (Clardy et al., 2009). Gli antibiotici rappresentano infatti, una prima linea di difesa di diversi microrganismi che producono e rilasciano nell’ambiente circostante gli antibiotici, per contrastare altri organismi con i quali entrano in competizione per le risorse nutrizionali, condividendo la stessa nicchia ecologica (Sass, 2023). Una grande varietà di molecole con attività antibatterica vengono prodotte dai microrganismi che parallelamente hanno anche sviluppato risposte adattative specifiche che consentono di reagire adeguatamente alla presenza di agenti antimicrobici, garantendo la loro sopravvivenza (Sass, 2023).

La storia dell’utilizzo degli agenti antimicrobici per il trattamento delle infezioni nell’uomo ha certamente radici molto antiche, ma si può cominciare a parlare di terapie antibiotiche moderne, solo dopo il 1928, anno in cui Alexander Fleming scopre la Penicillina. Il periodo successivo alla Seconda Guerra Mondiale, spesso conosciuto come “l’era d’oro degli antibiotici”, si

caratterizza per l'identificazione della maggior parte delle classi antibiotiche utilizzate ancora oggi (Muteeb et al., 2023).

L'impiego degli antibiotici per il trattamento delle malattie infettive ha quindi rappresentato uno dei più importanti successi nel campo della medicina. Ciononostante, l'uso massivo e indiscriminato di questi farmaci, soprattutto negli ultimi settant'anni, ha portato alla selezione di ceppi resistenti alla maggior parte degli antibiotici utilizzati in terapia. L'uso di ogni antibiotico porta prima o poi alla comparsa di microrganismi ad essi resistenti, basti pensare al fatto che le penicillinasi vennero identificate in *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* già prima dell'uso della penicillina nella pratica clinica, suggerendo che queste forme di resistenza erano già presenti nell'ambiente. Allo stesso modo ceppi MRSA (*S. aureus* meticillino-resistenti) sono emersi precocemente in seguito all'introduzione della meticillina come sostituto semi-sintetico per il trattamento di infezioni causate da ceppi di *S. aureus* resistenti alla penicillina. Questi sono solo due tra gli innumerevoli esempi che possono essere citati a testimonianza dell'estrema plasticità dei genomi batterici e della loro notevole capacità di adattamento a condizioni ambientali avverse come la presenza di elevate concentrazioni di antibiotici (Peterson & Kaur, 2018).

La resistenza ai farmaci antimicrobici, che comprendono antibiotici, antivirali, antimicotici e antiparassitari, si manifesta quando batteri, virus, funghi e parassiti risultano insensibili a tali farmaci rendendoli inefficaci e quindi non utilizzabili per la terapia. In questo modo, le infezioni diventano difficili o impossibili da eradicare incrementando il rischio di diffusione delle malattie, nonché la morbilità e la mortalità (WHO, www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance).

L'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), definisce l'antibiotico-resistenza da un punto di vista clinico e classifica i microrganismi sulla base della possibilità di trattare le infezioni di cui sono responsabili (Martinez, 2014). In particolare:

- S – Sensibile, regime di dosaggio standard: un microrganismo è classificato come “S” quando esiste un'elevata probabilità di successo terapeutico utilizzando un dosaggio standard dell'antibiotico.
- I – Intermedio, aumento dell'esposizione: un microrganismo è classificato come “I” quando vi è un'elevata probabilità di successo terapeutico purché l'esposizione all'antibiotico venga aumentata regolando il regime posologico o la concentrazione nel sito di infezione.
- R – Resistente: un microrganismo è classificato come “R” quando esiste un'elevata probabilità di fallimento terapeutico anche quando vi è una

maggior esposizione all'antibiotico. (EUCAST, www.eucast.org/newsiandr)

L'emergenza dell'antibiotico-resistenza tra i microrganismi rappresenta una delle sfide globali più importanti del XXI secolo e attira a sé l'attenzione di ricercatori da diverse aree scientifiche (Gabibov et al., 2020) coinvolte nella tutela della salute umana, animale e ambientale.

È stato stimato che, nel 2019, le infezioni causate da batteri antibiotico-resistenti sono state la causa principale di 1,27 milioni di decessi nel mondo, con maggiore mortalità nei bambini di età inferiore a 5 anni. (Karvanen & Cars, 2024). L'emergenza di ceppi patogeni resistenti, oltre a ridurre la capacità di trattare le comuni malattie infettive, rende anche difficoltosa l'applicazione della chemioterapia e di procedure chirurgiche salvavita come il trapianto di organi. Inoltre, le infezioni che colpiscono animali e piante riducono la produttività e minacciano la sicurezza degli alimenti.

È importante anche sottolineare che l'antibiotico-resistenza comporta costi economici significativi: la Banca Mondiale stima che potrebbero esserci, entro il 2050, aumenti dei costi sanitari di mille miliardi di dollari e perdite fino a 3,4 trilioni di dollari del prodotto interno lordo (PIL) entro il 2030.

Il problema dell'antibiotico-resistenza interessa indistintamente tutti i Paesi del mondo ma ha delle conseguenze ben più gravi in quelli a basso reddito nei quali la diffusione è favorita da diversi fattori: mancato accesso ad acqua potabile, inadeguate condizioni igienico-sanitarie (sia per gli esseri umani che per gli animali), scarsa prevenzione e controllo delle malattie infettive (nelle abitazioni, nelle strutture sanitarie e nelle aziende agricole), scarso accesso a vaccini, strumenti diagnostici e farmaci di qualità a prezzi accessibili (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>).

Attualmente la rapidità di diffusione di batteri multiresistenti (MDR) ossia di batteri resistenti a più di tre antibiotici contemporaneamente, si contrappone al lento e spesso inconcludente percorso di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici (De Oliveira et al., 2020).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha indicato con la sigla "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter spp.*) gli agenti patogeni contro cui la necessità di trovare antibiotici efficaci ha la massima priorità in quanto multiresistenti (MDR) e soprattutto resistenti anche ad antibiotici ultima risorsa. Queste specie batteriche si rendono responsabili di numerose infezioni nosocomiali talvolta

letali come: batteriemie, UTI, polmoniti, meningiti e infezioni di tessuti molli, soprattutto nelle unità di terapia intensiva.

Sebbene l'ambiente ospedaliero rappresenti il principale sito di isolamento, numerosi ceppi ESKAPE, sono stati frequentemente osservati nel suolo, nel cibo (frutta, verdura e prodotti di origine animale), in vari ambienti acquatici (acque superficiali e potabili, fiumi, dighe), nelle piante e nelle acque reflue (Denissen et al., 2022).

Comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'antibiotico-resistenza sviluppati da questi microrganismi è quindi cruciale per la messa a punto di nuovi farmaci efficaci nel trattamento delle infezioni (Santajit & Indrawattana, 2016).

1.1-1 Meccanismi di antibiotico-resistenza

Da un punto di vista evolutivistico, i batteri utilizzano due principali strategie “genetiche” per adattarsi all'esposizione agli antibiotici (Munita & Arias, 2016): essi possono esserne “intrinsecamente” resistenti (**resistenza endogena, naturale o primaria**), oppure possono acquisire la resistenza a seguito di mutazioni cromosomiche, ricombinazione o tramite trasferimento genico orizzontale di determinanti di resistenza (**resistenza esogena, acquisita o secondaria**).

Nello specifico, la resistenza intrinseca delle specie batteriche nei confronti di un determinato antibiotico è la diretta conseguenza di caratteristiche strutturali e funzionali della cellula (Blair et al., 2015). I meccanismi di resistenza intrinseca si esplicano a seguito dell'espressione di geni che fanno parte del genoma della cellula batterica e che sono raggruppati nel cosiddetto "resistoma intrinseco".

È interessante notare che i microrganismi intrinsecamente resistenti, hanno un'origine ambientale e quindi rispetto ai ceppi clinici non sono stati esposti a concentrazioni elevate di antibiotici. Infatti il resistoma intrinseco è un fenotipo evolutivamente antico e comune a tutti i ceppi di una specie batterica che non è stato acquisito a seguito del recente utilizzo di antibiotici a scopo terapeutico (Fajardo et al., 2008).

I principali meccanismi di resistenza endogena riguardano:

- assenza del target specifico dell'antibiotico all'interno della cellula,
- riduzione della permeabilità di membrana all'ingresso dell'antibiotico dovuta a variazioni nella composizione della membrana stessa o all'alterazione strutturale delle porine (Blair et al., 2015),
- trasporto attivo dell'antibiotico tramite pompe di efflusso, proteine transmembrana che trasportano attivamente una grande varietà di

composti tossici, inclusi gli antibiotici, all'esterno della cellula per impedirne l'accumulo intracellulare (Darby et al., 2023).

La resistenza acquisita invece si sviluppa quando viene espresso un nuovo tratto, spesso a causa di un cambiamento genetico selezionato nel contesto dell'esposizione agli antibiotici (Culyba et al., 2015); pertanto, batteri dapprima sensibili sviluppano un fenotipo resistente nei confronti dell'antibiotico portando all'uso di concentrazioni maggiori dello stesso o di combinazioni di diversi farmaci per trattare l'infezione di cui sono responsabili (Martínez, 2008).

Tra i meccanismi di resistenza secondaria vi sono:

- l'inattivazione o l'alterazione del farmaco tramite idrolisi o aggiunta di gruppi chimici,
- la modifica del sito target dell'antibiotico,
- la riduzione dell'accumulo intracellulare dell'antibiotico tramite una diminuzione *dell'uptake* o un aumento dell'efflusso,
- la capacità di produrre biofilm (Santajit & Indrawattana, 2016).

La resistenza acquisita è la conseguenza di differenti eventi genetici tra cui la comparsa di mutazioni sul cromosoma batterico (mutazioni puntiformi, inserzioni, delezioni o duplicazioni) (Jian et al., 2021). In questo caso un

sottoinsieme di cellule batteriche, derivante da una popolazione suscettibile, sviluppa una mutazione che gli consente di sopravvivere in presenza della molecola antimicrobica. Quest'ultima, eliminando la restante popolazione sensibile, favorisce la selezione dei mutanti resistenti (Munita & Arias, 2016).

Le mutazioni spontanee sono però eventi rari e di norma, vengono regolarmente corrette dai processi fisiologici della cellula (Martinez et al., 2009).

Pertanto, il maggiore impulso allo sviluppo delle resistenze acquisite è dato dal trasferimento genico orizzontale di determinanti di resistenza, provenienti probabilmente da microrganismi ambientali intrinsecamente resistenti (Munita & Arias, 2016).

1.2 Trasferimento genico orizzontale (HGT)

L'acquisizione dei geni di antibiotico-resistenza (ARGs) è dovuta principalmente ai cosiddetti elementi genetici mobili (MGE), (Santajit & Indrawattana, 2016) ossia sequenze di DNA capaci di muoversi a livello intracellulare ed intercellulare.

Gli MGE comprendono gli elementi coniugativi (plasmidi ed elementi integrativi e coniugativi [ICEs]), gli elementi trasponibili (trasposoni e integroni) e i batteriofagi. Tali elementi sono spesso associati a geni di antibiotico-resistenza, sono in grado di spostarsi autonomamente e casualmente

verso nuovi punti di una stessa o differente molecola di DNA, nell'ambito di una singola cellula o di cellule diverse. Poiché questi tipi di MGE sono spesso presenti in copie multiple nel genoma, possono facilitare fenomeni di ricombinazione omologa, contribuendo quindi non solo alla diffusione dell'antibiotico-resistenza ma favorendo anche il riarrangiamento genetico e di conseguenza la diversificazione ed evoluzione batterica (Tokuda, & Shintani, 2024).

I meccanismi intercellulari di scambio genetico includono la **coniugazione/mobilizzazione** (mediata dai plasmidi e dagli elementi coniugativi integrativi ICE), la **trasduzione** (mediata dai fagi) e la **trasformazione** (*uptake* di DNA extracellulare).

Insieme questi elementi giocano un ruolo di primo piano nel facilitare il trasferimento e la diffusione di geni di antibiotico-resistenza (Partridge et al., 2018).

Il trasferimento genetico orizzontale (HGT) rappresenta una delle più importanti forze evolutive dei batteri (Munita & Arias, 2016), consentendo alle specie microbiche di acquisire nuovo materiale genetico che può codificare tratti vantaggiosi in un determinato ambiente. Ad esempio, quando i batteri si trovano ad affrontare forti pressioni selettive, come la presenza di

antimicrobici, l'acquisizione orizzontale di ARGs consente la diversificazione dei genomi e aumenta la fitness.

L'HGT contribuisce, inoltre, al dilagare delle infezioni trasferendo geni di patogenicità che aumentano la virulenza dei microrganismi (Lerminiaux & Cameron, 2019).

1.2-1 Coniugazione batterica

La coniugazione batterica è il principale meccanismo di trasferimento, mediante HGT, per la diffusione di geni di virulenza e di antibiotico-resistenza nelle popolazioni batteriche (Cabezón et al., 2015). È noto che il processo di coniugazione si verifica in vari ambienti come il suolo, la superficie di oggetti inanimati o di organismi viventi, nonché nel lume dell'intestino, considerato un hot-spot genetico dei batteri di importanza clinica. (Frankel et al., 2023).

La coniugazione permette il trasferimento di elementi integrati nel genoma (elementi coniugativi integrativi ICE) o di plasmidi (Cooke & Herman, 2023).

I plasmidi sono ubiquitari nei batteri e possono essere definiti come una collezione di geni organizzati in un replicone autonomo, stabile e solitamente circolare che non contiene informazioni per le funzioni essenziali della cellula. (Waksman, 2019). Molti ARGs circolano tra i batteri attraverso la trasmissibilità dei plasmidi (Lerminiaux & Cameron, 2019).

La coniugazione batterica venne descritta la prima volta da Lederberg e Tatum intorno al 1940, successivamente alla scoperta del plasmide F e consiste nel trasferimento unidirezionale di un plasmide da un batterio (donatore) a un altro (ricevente) attraverso un contatto cellula-cellula (Frankel et al., 2023).

Nei Gram negativi, la coniugazione è mediata da un complesso macromolecolare associato alla membrana che forma il **sistema di secrezione di tipo IV coniugativo** (T4SS), che insieme a un macchinario di processamento del DNA chiamato “relaxosoma” e al “pilo” guida il trasferimento direzionale del plasmide (Waksman, 2019).

Nei plasmidi coniugativi, l'organizzazione dei geni è conservata nella maggior parte dei sistemi (*Figura 1*).

I geni che codificano per le proteine coinvolte nella formazione delle coppie di coniugazione (*Mpf*, *mating pair formation*) sono organizzati in operoni e sono separati dai geni implicati nel trasferimento del DNA (*Dtr*). I geni *mpf* codificano per proteine che si associano a formare il T4SS, mentre i geni *Dtr* codificano per proteine che legano il DNA a livello dell'origine di trasferimento (*oriT*), formando il relaxosoma (Cabezón et al., 2015).

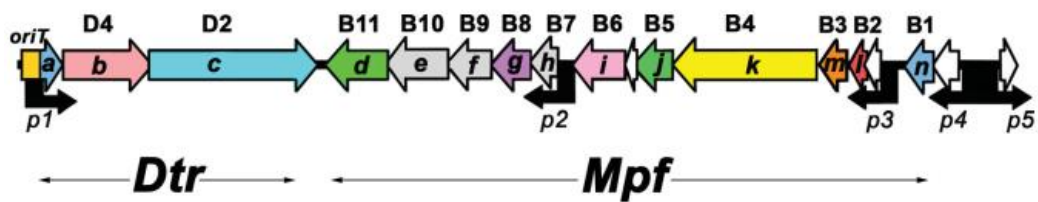


Figura 1. Struttura genetica delle regioni Mpf e Dtr del plasmide coniugativo R388. (Cabezón et al., 2015)

Nei batteri Gram-negativi, il macchinario macromolecolare funzionale è costituito da circa 12 subunità, costituite dalle proteine VirB (B1 - B11) e da VirD4 secondo la nomenclatura utilizzata per la superfamiglia del T4SS di *Agrobacterium tumefaciens* (Costa et al., 2021).

La struttura molecolare del T4SS riconosce 4 domini (Figura 2):

- Il **pilo**: formato dall'assemblaggio elicoidale di subunità di pilina (VirB2) e da un'adesina (VirB5).
- Il **complesso del canale centrale (core complex)** che può essere distinto in due subcomplessi: quello della membrana esterna (*OMCC, Outer membrane core complex*) costituito da VirB7, VirB9 e dall'estremità C-terminale di VirB10 e quello periplasmatico formato da VirB8, VirB10 e dall'estremità N-terminale di VirB6.
- Il **complesso della membrana interna (ICM, Inner membrane complex)**: formato dai domini transmembrana di VirB3, VirB6, VirB8 e VirB10.

- **ATPasi:** legati alla membrana interna sono presenti tre domini ATPasici esamerici: VirB4, VirB11 e la “proteina d’accoppiamento” VirD4 (Cabezón et al., 2015).

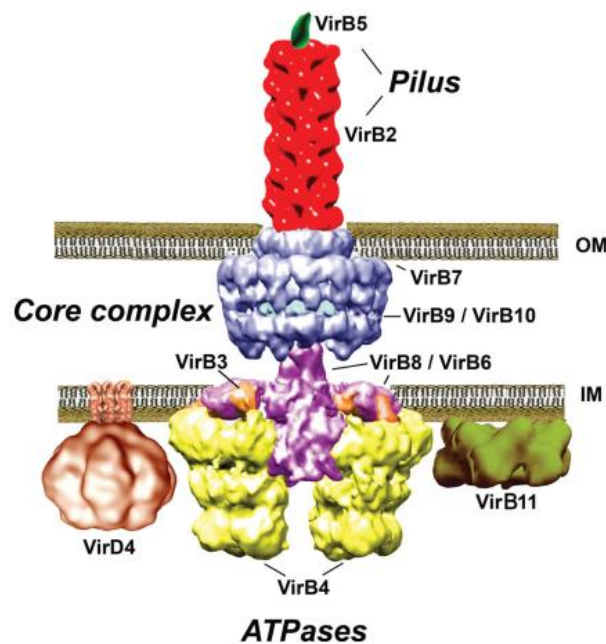


Figura 2. Architettura del T4SS coniugativo. (Cabezón et al., 2015)

Il processo di coniugazione può essere diviso in tre fasi.

- La prima fase si verifica all'interno del citosol del donatore e porta alla biogenesi del pilo sessuale e all'assemblaggio del sistema di secrezione di tipo IV (T4SS), coinvolto nel trasporto del materiale genetico.
- La seconda fase interessa sia il donatore che il ricevente e inizia con la formazione delle coppie di coniugazione (MPF) mediata dal pilo, seguita

dalla stabilizzazione delle coppie di coniugazione (*MPS, mating pair stabilization*).

- La terza fase riguarda il trasferimento del plasmide e l'espressione dei geni ad esso associati (Frankel et al., 2023).

La coniugazione comincia con l'assemblaggio del relaxosoma, costituito da una relaxasi e da proteine ausiliari, in corrispondenza dell'*oriT* del plasmide, a livello del quale la "relaxasi" agisce come fosfodiesterasi catalizzando il taglio specifico del sito "*nic*" interno all'*oriT*. Dopo il taglio, l'enzima rimane covalentemente legato all'estremità 5' del singolo filamento (T-strand) e questo complesso ssDNA+ proteine verrà trasportato dal T4SS. (Waksman, 2019).

A questo punto avviene la biosintesi del pilo tramite il sistema T4SS: dapprima le subunità di pilina (VirB2) vengono sintetizzate come precursori di pre-pilina contenenti una sequenza segnale N-terminale che, a livello della membrana interna, viene tagliata da una peptidasi ottenendo subunità mature di pilina. A causa della loro natura idrofobica, le molecole di pilina si accumulano all'interno del bilayer fosfolipidico della membrana interna e in seguito a specifici segnali, esse vengono traslocate nello spazio periplasmico con l'ausilio del dominio ATPasico del sistema T4SS. Le subunità di pilina vanno incontro ad oligomerizzazione e formano la struttura del pilo. (Cabezón et al., 2015).

Successivamente alla formazione del pilo, il T4SS cattura il relaxosoma precedentemente assemblato; si forma il complesso di pre-inizio che rimane silente fin quando non si ha uno stimolo esterno generato dal contatto del pilo con un recettore della membrana della cellula ricevente. Questo legame determina l'avvicinamento delle cellule per retrazione del pilo e la formazione di una "tight junction coniugativa" che favorisce il trasferimento. A questo punto avviene l'attivazione del relaxosoma che consiste nello svolgimento della molecola di ssDNA da parte dell'attività elicasica della relaxasi e infine il suo trasferimento alla cellula ricevente (Waksman, 2019).

Il sistema T4SS dei Gram-positivi mostra notevoli somiglianze con la controparte dei Gram-negativi; in particolare la fase del processamento del DNA plasmidico con le relaxasi covalentemente legate all'estremità 5', può considerarsi identica. Al contrario, la fase di traslocazione mostra delle differenze sostanziali dovute prevalentemente alla differente struttura degli involucri cellulari tra Gram positivi e Gram negativi; nel primo caso è infatti presente una membrana citoplasmatica seguita da una parete cellulare costituita da uno spesso strato di peptidoglicano, nel secondo caso sono presenti due membrane separate da uno spazio periplasmico in cui vi è un sottile strato di peptidoglicano (Goessweiner-Mohr et al., 2014).

Attualmente i T4SS dei Gram-positivi meglio caratterizzati, sono quelli codificati dai plasmidi **pAD1** e **pCF10** di *Enterococcus faecalis* (Grohmann et al., 2018). Questi plasmidi vengono efficientemente traslocati attraverso un sistema sofisticato che prevede il rilascio di piccoli peptidi, definiti feromoni sessuali, da parte delle cellule del ricevente (Goessweiner-Mohr et al., 2014). Nel caso specifico di pCF10, la molecola segnale è rappresentata dall'eptapeptide cCF10 (Dunny, 2007).

Come risultato, viene prodotta una proteina superficiale che promuove l'aggregazione tra la cellula donatrice e quella ricevente.

Ogni sistema di trasferimento viene attivato da differenti feromoni, ed è finemente regolato in modo che il trasferimento avvenga solo verso un gruppo ristretto di specie (Thomas & Nielsen, 2005).

Questi plasmidi contribuiscono alla crescente importanza degli enterococchi come patogeni opportunisti, in quanto permettono la diffusione di determinanti di resistenza agli antibiotici e di fattori di virulenza (Dunny, 2007).

Un altro importante plasmide coniugativo isolato per la prima volta in *Streptococcus agalactiae* e osservato successivamente in ceppi clinici di *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* è **pIP501**. (Grohmann et al., 2018).

L'organizzazione dei geni all'interno di pIP501 rispecchia sostanzialmente quella presente nei plasmidi coniugativi dei Gram-negativi.

In particolare, è presente la regione che codifica per la relaxasi TraA che oltre ad avere la funzione di taglio, regola negativamente l'espressione delle altre proteine codificate dall'operone *tra*, autoregolando sé stessa (Goessweiner-Mohr et al., 2014).

Le altre famiglie di proteine presenti nel sistema T4SS sono le **ATPasi**, le **muramidasi**, le proteine del **complesso del canale centrale** e le **adesine**. (Goessweiner-Mohr et al., 2013).

La regione *tra* del plasmide codifica per due ATPasi: TraE che mostra similarità con VirB4 e TraJ simile alla “coupling protein” VirD4. TraE si lega alla muramidasi TraG e a TraN, una proteina citosolica che lega il dsDNA. È stato postulato un forte legame anche con TraH e TraJ e ciò suggerisce che TraE è coinvolto direttamente nella formazione del canale di trasferimento e nel trasporto del substrato. TraJ agisce come proteina di accoppiamento permettendo l'interazione tra il complesso proteina-DNA del relaxosoma e il canale di traslocazione. La muramidasi TraG crea dei tagli all'interno del peptidoglicano formando un canale.

Le proteine TraM (omologa di VirB8) e TraL (omologa di VirB6) sono due componenti del canale centrale con un ruolo strutturale, mentre TraO agisce come adesina superficiale (*Figura 3*). (Goessweiner-Mohr et al., 2014).

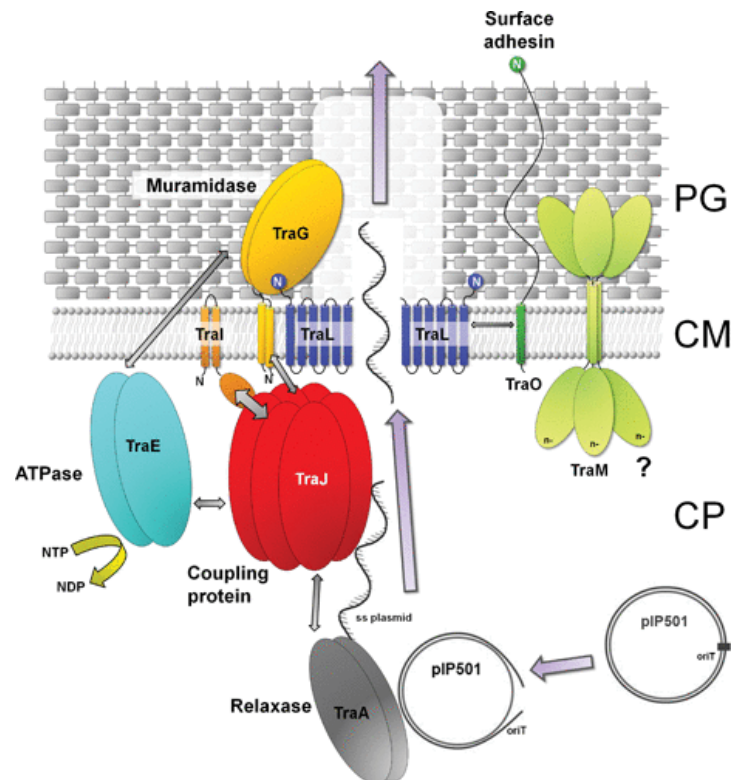


Figura 3. Modello di trasferimento del plasmide pIP50. (Goessweiner-Mohr et al., 2014)

Nei Gram-positivi è stato studiato anche un altro meccanismo di coniugazione non convenzionale. Nello specifico, ceppi di *Streptomyces* presentano un sistema di traslocazione del DNA a doppio filamento codificato da un unico plasmide coniugativo e in cui è implicata una sola proteina, TraB. (Goessweiner-Mohr et al., 2013). In generale questi plasmidi non contengono

geni di resistenza ma trasportano informazioni relative alla replicazione e alla trasmissibilità (Grohmann et al., 2003).

1.3 Diffusione dei geni di antibiotico-resistenza nell'ambiente

La comparsa di batteri patogeni resistenti agli antibiotici rappresenta un'importante problema di salute pubblica in tutto il mondo. Tuttavia, i geni di antibiotico-resistenza (ARGs) non sono confinati esclusivamente ai ceppi che circolano in ambito clinico ma sono ampiamente diffusi in diverse popolazioni batteriche presenti nell'ambiente naturale (Jian et al., 2021).

In effetti il ruolo dell'ambiente nella diffusione degli ARGs è stato solo recentemente messo in evidenza. Esso infatti contribuisce a questo fenomeno in vari modi: innanzitutto consente il trasferimento di ARGs tra batteri ambientali, umani e animali, costituisce un importante reservoir di batteri resistenti (*ARB, Antibiotic Resistant Bacteria*) e di ARGs e infine può svolgere un ruolo cruciale nell'evoluzione di nuovi fattori di resistenza (Bengtsson-Palme et al., 2021).

Sebbene la presenza di determinanti di resistenza nei batteri ambientali non rappresenti un rischio per la salute pubblica, la loro mobilitazione verso nuove cellule ospiti e la loro espressione in diversi contesti può tramutarsi in un problema di grande entità (Peterson & Kaur, 2018).

Probabilmente, gli ARGs si sono evoluti gradualmente a partire da geni con funzioni diverse; gli eventi evolutivi più recenti responsabili della loro diffusione tra i patogeni sono riconducibili ad eventi di trasferimento da specie ancestrali, durante i quali è stata modificata la loro funzione.

Il primo step indispensabile è l'acquisizione di mobilità da parte di un ARG all'interno del genoma, attraverso la sua associazione con elementi genetici mobili (MGE); la seconda fase prevede la ricollocazione del gene in un elemento che può essere trasferito ad altre cellule (come un plasmide). Successivamente deve verificarsi un evento di trasferimento genico orizzontale (HGT) del gene direttamente ad un agente patogeno o attraverso ospiti intermedi. L'ultimo passaggio prevede l'introduzione del batterio portatore della resistenza nel microbiota umano o animale. Tutti questi passaggi si verificano anche in assenza di antibiotici ma possono essere velocizzati dalla loro presenza nell'ambiente (Larsson & Flach, 2022).

Nonostante la produzione naturale di molecole antibiotiche abbia contribuito all'evoluzione degli ARGs, essa non è comunque la responsabile della loro rapida diffusione. Gli antibiotici prodotti dai microrganismi agiscono su microscala, mentre quelli artificiali agiscono su macroscala e sono tipicamente associati a pressioni selettive su intere comunità microbiche.

Il rilascio di antibiotici nell'ambiente in quantità elevata deriva dal loro utilizzo per le attività antropiche e dalla loro successiva escrezione come molecole ancora attive (Larsson & Flach, 2022). Le principali fonti di contaminazione dell'ambiente derivano da: acque reflue domestiche ed ospedaliere che contengono circa 100-1000 ng/L di antibiotici, effluenti provenienti da industrie farmaceutiche, da allevamenti di bestiame, e da acquacoltura: la dispersione di escrementi animali contenenti metaboliti di antibiotici e il loro utilizzo come fertilizzanti in campo agricolo inquina le acque sotterranee e i corsi d'acqua attraverso il deflusso (Bombaywala et al., 2021).

La diffusione di batteri resistenti e degli ARGs avviene in habitat che favoriscono eventi di ricombinazione e trasferimento genico orizzontale (HGT). La microflora umana e animale rappresenta l'habitat primario in cui gli antibiotici utilizzati a scopo preventivo e terapeutico esercitano la loro azione; il tratto gastro-intestinale infatti fornisce un ambiente ideale per i batteri dove le dosi sub-letali di antibiotici possono creare condizioni favorevoli per la propagazione delle antibiotico-resistenze (Mutuku et al., 2022).

L'intestino dell'uomo e degli animali a sangue caldo è infatti il principale serbatoio di batteri antibiotico-resistenti; inoltre, l'analisi metagenomica del microbioma intestinale ha evidenziato un'enorme diversità di ARGs che possono essere trasferiti tra i microrganismi all'interno dell'intestino (Anthony

et al., 2020). Il fenomeno della coniugazione, in particolare, sarebbe favorito dalla presenza di un'elevata densità cellulare e dalla presenza di un abbondante strato di muco che permettono il contatto cellula-cellula (McInnes et al., 2020).

Un habitat secondario in cui si possono verificare scambi genetici tra batteri può essere rappresentato da ambienti come gli ospedali, strutture di assistenza agli allevamenti animali, dove c'è sovraffollamento e possibile esposizione di individui suscettibili. Gli antibiotici e altri residui antimicrobici presenti nelle acque reflue finiscono negli impianti di trattamento dei reflui che rappresentano un terzo habitat ideale per lo scambio genetico essendo caratterizzati dall'abbondanza di nutrienti organici e inorganici e da condizioni di temperatura e pH che favoriscono la crescita batterica e le interazioni microbiche. Il suolo, i sedimenti e gli ambienti acquatici sotterranei e superficiali rappresentano poi, l'habitat finale in cui batteri provenienti da altri habitat si mescolano e interagiscono con le più ampie comunità microbiche ambientali. L'interconnessione tra i vari livelli favorisce la circolazione nell'ecosistema di batteri resistenti e di ARGs che possono eventualmente essere reintrodotti negli ambienti umani e animali (Mutuku et al., 2022).

Anche gli oceani rappresentano un vasto reservoir di batteri portatori di ARGs. Tuttavia, gli studi a riguardo sono ancora pochi e la diversità e la prevalenza degli ARGs variano con la latitudine e la profondità dell'ambiente oceanico. In

uno studio in cui sono stati analizzati dati di metagenomica provenienti da 181 campioni marini prelevati a diverse profondità e in diverse aree geografiche è emerso che nel resistoma marino era possibile riconoscere un pool di geni comuni (un *core* genico) ai diversi campioni e ai diversi ambienti oceanici. Questo core genico era costituito da geni che conferivano principalmente la resistenza ai glicopeptidi e ai beta-lattamici o la resistenza multifarmaco; dallo studio è emerso inoltre che il trasferimento genico orizzontale era limitato da barriere filogenetiche, essendo più frequente tra microrganismi appartenenti alla stessa specie piuttosto che a specie diverse. Le specie batteriche che portavano questi ARG appartenevano inoltre a specie prettamente marine. L'attività antropica può portare all'alterazione dei livelli di nitrati e fosfati marini nonché a variazioni della temperatura oceanica influenzando quindi il metabolismo e la crescita microbica e di conseguenza l'espressione dei determinanti di resistenza. Inoltre ARGs derivanti dalle attività umane sono stati ritrovati anche in ecosistemi marini profondi, dimostrando che la contaminazione interessa anche ambienti più remoti (Xu et al., 2023).

La trasmissione all'uomo di agenti patogeni MDR presenti in ambienti acquatici può avvenire per contatto diretto con l'acqua in seguito ad attività ricreative e ingestione di acqua contaminata oppure per ingestione di cibo crudo

o poco cotto entrato in contatto con acqua contaminata (mitili, pesci, frutta e verdura) (*Figura 4*).

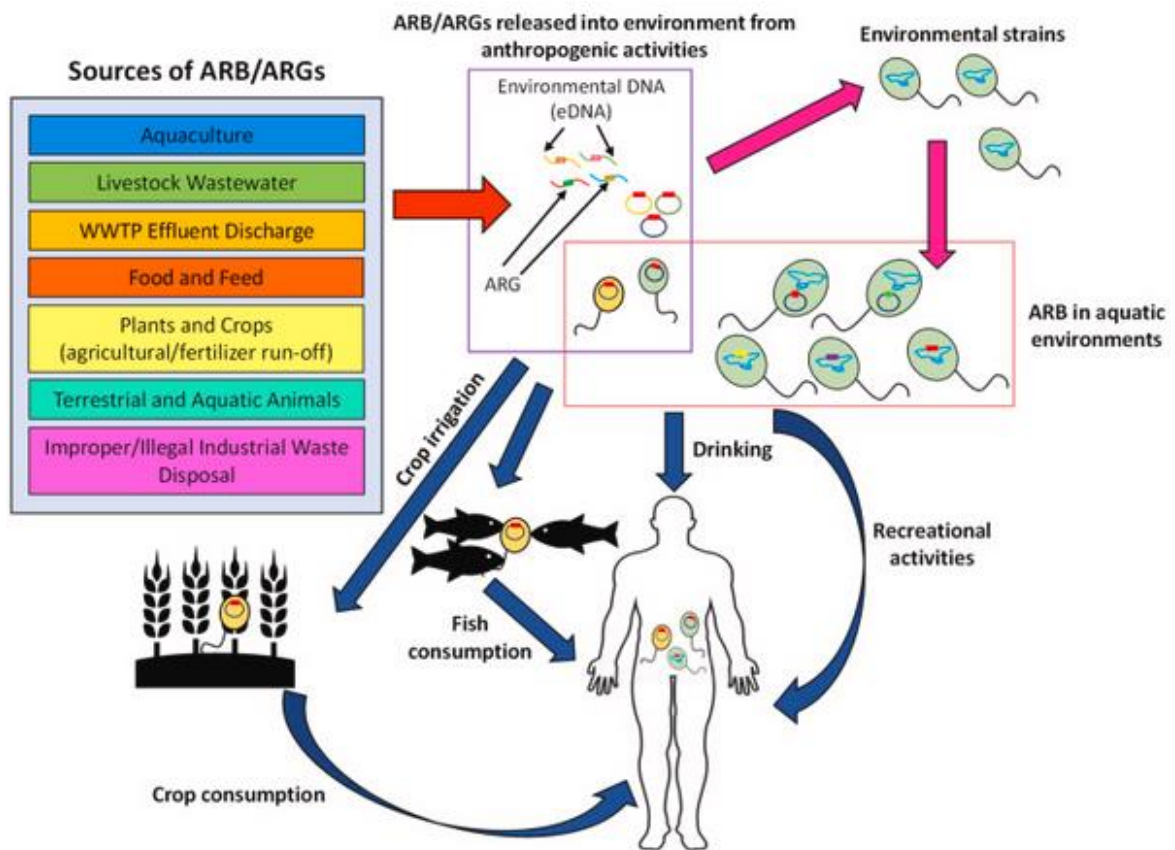


Figura 4. Possibili vie di trasmissione di batteri antibiotico-resistenti (ARBs) e geni di antibiotico-resistenza (ARGs) all'uomo. (Denissen et al., 2022)

Le malattie legate all'acqua rappresentano la più importante causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo. Gli agenti patogeni "trasmessi dall'acqua" sono fondamentalmente microrganismi di origine fecale che fanno parte del microbiota umano e animale (Stec et al., 2022).

Le comunità batteriche presenti nelle varie fonti di acqua e nei sistemi di distribuzione possono avere un effetto sulla qualità dell'acqua destinata al consumo o ad uso ricreativo. È pertanto, di importanza fondamentale monitorare questo aspetto tramite l'utilizzo di batteri indicatori di contaminazione fecale (*FIB*). (Stec et al., 2022).

1.4 Indicatori di contaminazione batterica fecale (FIB)

La contaminazione microbica dei siti di balneazione dovuta a effluenti fognari, deflussi agricoli e rilasci accidentali da fonti fognarie comunali, costituisce un importante rischio per la salute pubblica, in quanto espone l'uomo a vari tipi di infezioni, tra cui quelle gastrointestinali e respiratorie (Tiwari et al., 2021).

È stato stimato che circa 90 milioni di casi di infezione e costi per oltre 2 miliardi di dollari annui possano essere attribuiti ad una bassa qualità dell'acqua sulle spiagge statunitensi (Searcy et al., 2023).

Il rischio di insorgenza e diffusione di infezioni nell'uomo, dipende dall'esposizione a diversi agenti patogeni autoctoni dell'ambiente acquatico come *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio* spp. ma anche e soprattutto dall'esposizione a microrganismi patogeni che riconoscono come habitat preferenziale il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a

sangue caldo e che si ritrovano in ambiente acquatico a seguito di episodi di contaminazione fecale (Briancesco, 2005).

Tra questi si possono citare microrganismi dichiaratamente patogeni come *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* e microrganismi patogeni opportunisti come i batteri Gram-positivi del genere *Enterococcus*.

Emerge quindi l'importanza del rispetto degli standard microbiologici delle acque ricreative e di quelle destinate al consumo per prevenire la presenza di microrganismi patogeni, e assicurare che la loro quantità non superi i limiti imposti dalla legge (Stec et al., 2022).

Poiché gli agenti patogeni sono caratterizzati da un'ampia diversità biologica, sono presenti in modo intermittente e a basse concentrazioni nell'ambiente acquatico e non esistono metodi standardizzati per l'analisi, la loro rilevazione e quantificazione risulta laboriosa. Inoltre, il monitoraggio diretto di un singolo patogeno può fornire solo indicazioni specifiche sullo stesso e non consente di valutare la presenza di altri potenziali contaminanti. Per tali ragioni, la valutazione della qualità microbiologica delle acque si basa sulla quantificazione di microrganismi surrogati di origine fecale, i cosiddetti batteri indicatori fecali (FIB). Essi costituiscono uno strumento di screening dei patogeni e consentono un monitoraggio semplice ed economico dei

cambiamenti della qualità microbiologica dei corpi idrici (Rodrigues & Cunha, 2017).

Affinché i FIB possano essere definiti tali, devono rispettare dei requisiti ben precisi:

- devono essere presenti nell'acqua contemporaneamente ai microrganismi patogeni
- la loro concentrazione nell'acqua deve rispecchiare quella dei patogeni e quindi essere un'indicazione del grado di inquinamento microbiologico
- la loro sopravvivenza in acqua e la loro resistenza nei confronti dei trattamenti di depurazione deve essere paragonabile a quella dei patogeni
- non devono essere patogeni
- devono avere caratteristiche immutabili nel tempo
- non devono essere in grado di moltiplicarsi in ambiente acquatico
- devono essere rilevabili con metodi semplici, rapidi ed economici.

L'utilizzo degli indicatori batterici di contaminazione fecale (FIB) non consente una stima diretta della presenza di un dato microrganismo patogeno nell'ambiente idrico ma piuttosto permette di valutare la probabilità che esso sia presente. Inoltre, la ricerca degli indicatori, rispetto a quella diretta dei

singoli patogeni, è indipendente dall'endemicità di alcune infezioni microbiche (Briancesco, 2005).

Storicamente, gli indicatori di contaminazione fecale utilizzati erano quelli appartenenti al gruppo dei coliformi (coliformi totali, coliformi fecali, *E. coli*), streptococchi (enterococchi e streptococchi fecali) e microrganismi sporigeni (*Clostridium perfringens*).

Da un punto di vista tassonomico, i coliformi appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*; alcuni di essi sono comuni nell'intestino di mammiferi ed uccelli (FC, coliformi fecali), mentre altri si ritrovano nel suolo e sulla superficie delle piante (non fecali), pertanto questi batteri non sono del tutto affidabili come FIB. I coliformi fecali vengono pertanto, sostituiti dai coliformi termotolleranti, i quali però sono stati spesso ritrovati in campioni ambientali in assenza di contaminazioni fecali. Poiché *E. coli* è costantemente presente nelle feci umane, e animali sia domestici che d'allevamento in modo preponderante rispetto ad altri coliformi, questo batterio è considerato il più idoneo da utilizzare come FIB.

In aggiunta a questo, nel corso del tempo, sono stati utilizzati anche altri indicatori, come gli enterococchi intestinali e le spore e/o le forme vegetative di *C. perfringens*. Gli enterococchi intestinali sono un sottogruppo di

microrganismi definiti come streptococchi fecali. Si tratta di cocchi Gram positivi tassonomicamente eterogenei associati al tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e includono varie specie di streptococchi (*S. bovis*, *S. equinus*) e di enterococchi (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. cecorum*). In particolare, gli enterococchi si contraddistinguono per la capacità di proliferare a temperature comprese tra 10°C e 45°C, in presenza di NaCl al 6,5% e a pH 9.6 per 30 minuti, riducono il blu di metilene allo 0,1% e sono positivi alla reazione con gli antisieri del gruppo D di Lancefield. Gli enterococchi intestinali sono in grado di sopravvivere in varie condizioni ambientali, compresi estremi di temperatura e concentrazioni saline, e grazie alla loro ubiquità nelle feci umane e alla persistenza nell'ambiente, sono ad oggi considerati tra i migliori indicatori della qualità dell'acqua marina (Rodrigues & Cunha, 2017).

Nel 1986 l'USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) ha pubblicato dei criteri di qualità per l'acqua ad uso ricreativo, i quali sono stati poi revisionati nel 2012. Essi si basano sull'utilizzo esclusivo di *E. coli* ed *Enterococcus spp.* come FIB. *E. coli* è comunemente impiegato nei sistemi di acqua dolce, mentre le specie di *Enterococcus* sono preferite per le acque marine per la loro maggiore tolleranza alla salinità. Gli enterococchi fecali sono indicati dalle direttive dell'OMS come unico parametro regolatorio e la loro

presenza indica una contaminazione di lunga data (Hart et al., 2024; Stec et al., 2022).

1.5 *Enterococcus spp.*

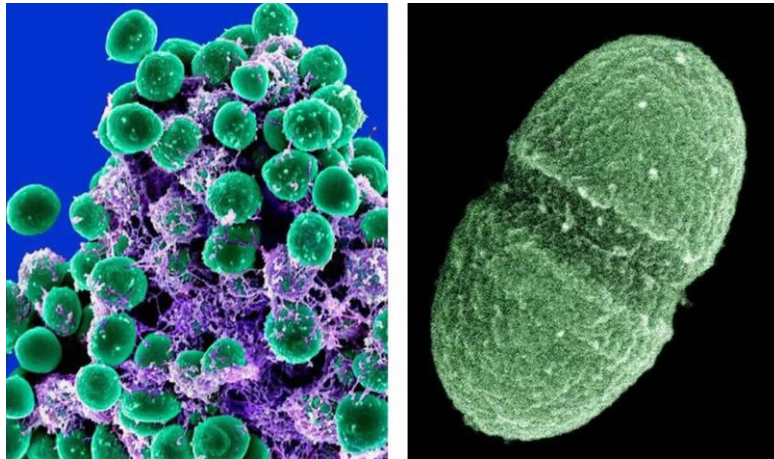


Figura 5. Enterococcus faecalis (<https://healthjade.net/enterococcus-faecalis/>)

Il genere *Enterococcus* comprende un gruppo di batteri Gram-positivi ubiquitari che possono essere isolati da varie fonti: suolo, ambienti acquatici, superficie delle piante, prodotti alimentari fermentati. Sono una componente importante del microbiota intestinale sia di vertebrati che invertebrati. Nello specifico si ritrovano nel tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo, compreso l'uomo (García-Solache & Rice, 2019; Selleck et al., 2019).

Poiché condividono caratteristiche morfologiche e biochimiche con gli streptococchi, sono stati a lungo considerati parte del genere *Streptococcus* e

classificati come streptococchi del gruppo D di Lancefield; solo nel 1984 vengono inclusi nel genere a sé stante *Enterococcus* (García-Solache & Rice, 2019).

Gli enterococchi hanno forma coccoide, esistono come cellule singole o a coppie e spesso si dispongono a formare dei gruppi o catene (*Figura 5*). Sono asporigeni, anaerobi facoltativi chemiorganotrofi con metabolismo omofermentativo e producono acido lattico come principale prodotto del metabolismo fermentativo degli zuccheri. Gli enterococchi sono per la maggior parte, ossidasi e catalasi-negativi, alotolleranti (fino a 6,5% di NaCl), resistenti alla bile (fino a 40%), idrolizzano l'esculina e sono in grado di crescere in presenza di sodio azide (fino allo 0,4%) (García-Solache & Rice, 2019).

Da un punto di vista ecologico, hanno la capacità di crescere a temperature comprese tra 10°C e 45°C, con optimum di crescita tra i 35°C e 37°C e sono spiccatamente resistenti all'essiccamento. Su piastre di agar sangue, producono colonie non emolitiche o α -emolitiche, più raramente β -emolitiche, con diametro di 1-2 mm e dall'aspetto umido (García-Solache & Rice, 2019).

Gli enterococchi sono considerati microrganismi commensali del tratto gastrointestinale umano ma sono comunque capaci di causare una varietà di infezioni opportunistiche molto severe, soprattutto nei pazienti ospedalizzati

sottoposti a terapie antibiotiche prolungate. In modo particolare si rendono responsabili di infezioni del tratto urinario (UTI), batteriemie, endocarditi, infezioni di ustioni e ferite chirurgiche, infezioni addominali e dei dotti biliari e infezioni di cateteri e altri dispositivi medici da impianto (García-Solache & Rice, 2019).

Gli enterococchi si trovano al terzo posto nella lista dei principali patogeni nosocomiali. È stato stimato che tra il 2011 e il 2014 hanno causato oltre il 14% di infezioni nosocomiali (*Hospital-Acquired Infection, HAI*) negli USA e inoltre sono responsabili del 5-20% delle endocarditi comunitarie (Selleck et al., 2019).

Ad oggi fanno parte del genere *Enterococcus* oltre 50 specie, ma quelle prevalentemente isolate dall'uomo e rilevanti da un punto di vista clinico sono *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* responsabili del 75% delle infezioni enterococciche. *E. faecalis* è il quinto microrganismo maggiormente isolato dalle infezioni del tratto urinario nei pazienti cateterizzati e il terzo isolato da infezioni associate all'uso di catetere venoso centrale, mentre *E. faecium* è rispettivamente all'undicesimo e al quinto posto come causa di queste stesse infezioni (García-Solache & Rice, 2019; Selleck et al., 2019).

Gli enterococchi non sono microrganismi particolarmente virulenti; il successo di *E. faecalis* ed *E. faecium* in ambiente ospedaliero è dovuto principalmente alla loro capacità di adattarsi a condizioni ostili come, ad esempio, la presenza di antimicrobici. Tuttavia, in entrambe le specie sono stati individuati dei tratti di virulenza che sono correlati alla loro patogenicità. Questi includono: meccanismi di elusione del sistema immunitario umano, la capacità di aderire a cellule ospiti, alla matrice extracellulare e a materiali inerti (come, per esempio, i dispositivi medici) e la capacità di formare biofilm che li rendono maggiormente resistenti all'azione degli antibiotici e all'attacco dei fagociti.

Il quadro clinico delle infezioni causate dagli enterococchi è aggravato infatti dalla loro limitata sensibilità agli antibiotici e dalla tendenza ad acquisire nuovi tratti di resistenza. (García-Solache & Rice, 2019; Selleck et al., 2019).

1.5-1 Antibiotico-resistenza negli enterococchi

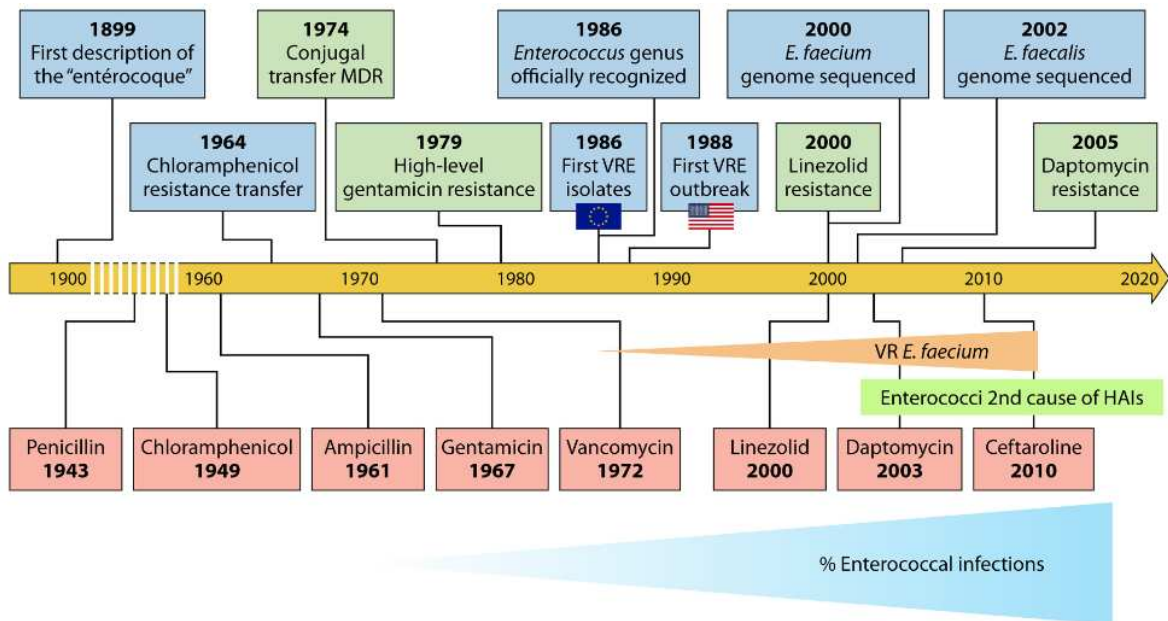


Figura 6. Cronologia degli eventi rilevanti nella storia degli enterococchi come patogeni umani (rettangoli blu), comparsa di resistenza agli antibiotici (rettangoli verdi), introduzione clinica degli antibiotici (rettangoli rosa). (García-Solache & Rice, 2019)

Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti a molteplici classi di antibiotici. In aggiunta a questo, la resistenza intrinseca li pone in una posizione favorevole per l'acquisizione di ulteriori resistenze: nel paziente trattato con antibiotici, gli enterococchi si concentrano in numero elevato e coesistono intimamente con altri batteri che portano geni di resistenza su elementi genetici mobili (MGE). L'elevata probabilità di contatto rende semplice il trasferimento di tali geni e la loro acquisizione da parte degli enterococchi.

Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti alla maggior parte dei β -lattamici e risultano in parte sensibili solo ad alcune penicilline (ampicillina,

penicillina). Sono totalmente resistenti a tutte le cefalosporine (con sporadiche eccezioni, come ceftarolina e ceftobiprole che hanno attività *in vitro* contro *E. faecalis*). La resistenza si esplica soprattutto tramite l'espressione di una PBP a bassa affinità di legame, denominata PBP4 in *E. faecalis* e PBP5 in *E. faecium*. Gli enterococchi sono anche intrinsecamente resistenti alla clindamicina, al trimetoprim-sulfametoxazolo e alle concentrazioni clinicamente raggiungibili di aminoglicosidi. La resistenza agli **aminoglicosidi**, in particolare è stata attribuita alla scarsa penetrazione di queste molecole attraverso l'involucro cellulare. In associazione con antibiotici attivi sulla parete, come i β -lattamici, hanno però dimostrato una certa efficacia. La scoperta di un rapporto sinergico tra β -lattamici e aminoglicosidi ha permesso l'applicazione di una terapia combinatoria che ha rappresentato uno standard nel trattamento delle infezioni enterococciche; tuttavia, pochi anni dopo l'introduzione di questa associazione sono emersi ceppi che hanno espresso elevati livelli di resistenza agli aminoglicosidi, dovuti all'espressione di enzimi che modificano chimicamente l'antibiotico rendendolo inutilizzabile e annullando il beneficio sinergico della combinazione in ambito clinico. Il gene che codifica per l'enzima più comune che conferisce resistenza alla gentamicina (e ad altri aminoglicosidi, eccetto la streptomicina) è *aac-6' - Ie-aph-2''*, classicamente presente all'interno di un trasposone (Tn4001).

La **vancomicina** è stata introdotta alla fine degli anni '50 con un'applicazione limitata ai pazienti ospedalizzati con allergie ai β -lattamici e con infezioni causate da batteri resistenti ad altre classi antibiotiche. Si è rivelata efficace anche contro gli enterococchi resistenti agli aminoglicosidi diventando una delle terapie alternative d'elezione tra gli anni '70 e '80. Tuttavia, anche in questo caso ceppi vancomicino-resistenti sono emersi precocemente. Gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci) costituiscono ad oggi più dell'80% di tutti gli isolati ospedalieri. Il rapido aumento dei ceppi VRE all'inizio del XXI secolo ha rappresentato un problema di grande importanza poiché ha eliminato la possibilità di applicare una terapia battericida di ultima risorsa. La resistenza alla vancomicina è mediata dall'acquisizione dell'operone *van*. Ne sono stati identificati otto ma i più diffusi sono *vanA* e *vanB*. Nello specifico, *vanA* (il più importante clinicamente) è associato al trasposone Tn1546 che possiede dei geni che, in presenza dell'antibiotico, inducono la sintesi di un precursore del peptidoglicano modificato, il cui dimero terminale D-Ala-D-Ala (il bersaglio naturale della vancomicina) della catena peptidica è sostituito da un dimero differente (solitamente D-Ala-D-lattato) determinando il mancato riconoscimento da parte dell'antibiotico.

La diffusione dei ceppi VRE rende necessaria la ricerca di opzioni terapeutiche alternative; il **linezolid** è una di queste. Questo oxazolidinone, approvato per la prima volta nel 2000 negli USA e nel 2001 nel Regno Unito, è un noto agente batteriostatico con estesa attività sui Gram-positivi, soprattutto nel trattamento di infezioni (polmonari, cutanee e dei tessuti molli) causate da MRSA e nella terapia di infezioni da VRE. Il linezolid è in grado di legare l'rRNA 23S nel dominio V, impedendo la formazione del complesso d'inizio funzionale tra mRNA, ribosoma e formilmethionina-tRNA, inibendo così la sintesi proteica. Il meccanismo di resistenza più comune si basa su una mutazione a carico dei geni che codificano per l'rRNA 23S, che causa la modifica del sito dell'rRNA riconosciuto e legato dal farmaco. Recentemente ha destato preoccupazione l'emergenza di resistenze al linezolid associate all'acquisizione dei geni *cfr* e *optrA* spesso portati da plasmidi coniugativi o trasferibili. Il *cfr* codifica per una rRNA metiltrasferasi che modifica un residuo di adenina dell'rRNA 23S e conferisce resistenza a 5 classi di antibiotici incluso il linezolid. Il fenotipo di resistenza conferito dal gene *cfr* va infatti sotto il nome di PhLOPS_A, un acronimo per indicare la resistenza a fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutilina e streptogramina A. Da sottolineare inoltre che il *cfr* è localizzato su plasmidi coniugativi e spesso è associato ad elementi mobili come la IS256 che è molto comune in ceppi multiresistenti di stafilococchi ed

enterococchi ed è stata riconosciuta come la responsabile della diffusione di molti geni di resistenza. Questo potrebbe spiegare la facilità con cui *cfr* viene trasferito anche tra batteri appartenenti a specie diverse e la rapidità della sua disseminazione in ambito clinico (Miller et al., 2014). Plasmidi *cfr*-positivi sono stati descritti inizialmente in ceppi animali di *Staphylococcus sciuri* e successivamente tra gli enterococchi venne descritto per la prima volta in un ceppo di *E. faecalis* di origine animale (Bender et al., 2018).

Il gene *optrA* negli enterococchi venne invece identificato per la prima volta nel 2011 e conferisce resistenza agli oxazolidinoni e ai fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo). È stato ritrovato in ceppi di *E. faecalis* ed *E. faecium* sia di origine animale che umana e codifica per una proteina appartenente ad una superfamiglia di proteine trasportatori di tipo ABC, chiamata *ATP-binding cassette-F* (ABC-F), che media la resistenza agli oxazolidinoni con un meccanismo di protezione ribosomale (García-Solache & Rice, 2019; Miller et al., 2014; Selleck et al., 2019; Torres et al., 2018).

Nel 2018 in un ceppo MRSA isolato da campioni respiratori di un paziente italiano, viene ritrovata un'altra proteina ABC-F con il 32% di similarità di sequenza con la proteina *optrA*. Questa proteina codificata dal gene *poxtA* conferisce resistenza ad oxazolidinoni, fenicoli e tetracicline. Una variante di questo gene è stata ritrovata più recentemente in ceppi di *E. faecalis* di origine

suina e inoltre sono stati segnalati ceppi di *E. faecium* isolati da campioni ambientali e animali in cui erano presenti plasmidi che portavano copie multiple del gene *poxA* delimitato dalla IS1216E (Cinhi et al., 2022; Wang et al., 2023).

I geni *poxA* finora descritti negli enterococchi sono trasportati da plasmidi, ma soprattutto è l'associazione ad elementi mobili come la IS1216 che sembra aver favorito la disseminazione del gene tra gli enterococchi sia in ambito clinico che no. Emerge pertanto la necessità di monitorare la resistenza al linezolid mediata da *poxA* in quanto potrebbe limitare le opzioni terapeutiche nei confronti degli enterococchi MDR (Shan et al., 2020, 2022).

1.5-2 Enterococchi in ambiente marino e nei mitili

Gli enterococchi sono comuni commensali dell'intestino di molti animali ma sono in grado di colonizzare anche habitat extra-intestinali come l'ambiente marino (Byappanahalli et al., 2012, Heim et al., 2023). La presenza di tali microrganismi nell'ecosistema marino si deve principalmente allo sversamento di reflui di diversa provenienza oppure a deposizione fecale diretta. All'interno dell'acqua gli enterococchi si trovano a sperimentare condizioni ambientali completamente differenti da quelle esistenti nel tratto gastrointestinale e questa transizione di habitat, può determinare la loro rapida inattivazione, ma anche

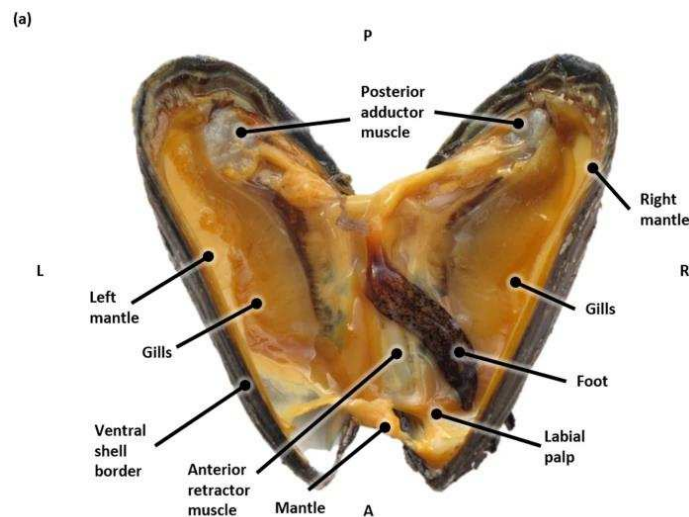
un certo grado di persistenza se non addirittura crescita in risposta a vari fattori biotici e abiotici, quali l'esposizione solare, la temperatura, la salinità, la disponibilità di nutrienti e la densità di potenziali predatori. In questo ambiente gli enterococchi possono rimanere planctonici, depositarsi nei sedimenti o sulle spiagge o aderire alla vegetazione marina (Korajkic et al., 2019; Heim et al., 2023).

Come ampiamente descritto in precedenza, gli enterococchi sono considerati importanti patogeni umani soprattutto per la loro tendenza ad acquisire geni di antibiotico-resistenza. Gli enterococchi portatori di ARGs si ritrovano sia in colonna d'acqua che nel sedimento e all'interno della catena trofica. L'isolamento di batteri resistenti agli antibiotici dalle specie marine e dall'acqua di mare rappresenta un importante rischio per la salute umana.

Particolare attenzione va posta ai molluschi bivalvi filtratori (come i mitili) che vivono nelle zone costiere e degli estuari e si nutrono filtrando grandi quantità di acqua; l'attività di filtrazione determina l'accumulo all'interno del loro tratto alimentare di un'ampia varietà di microrganismi patogeni e tossine soprattutto se l'acqua è contaminata da liquami e/o inquinanti chimici. Possono rappresentare quindi anche un reservoir di geni di antibiotico-resistenza. (Barros et al., 2011; Fleming et al., 2006). Un recente studio (Heim et al., 2023) su enterococchi isolati da bivalvi lungo le coste norvegesi ha messo in evidenza

come il 61% dei campioni di bivalvi provenienti da diversi siti contenevano enterococchi, sebbene a basse concentrazioni, e le specie più frequenti erano *E. faecium*, *E. hirae* e *E. faecalis*. Inoltre, il 40% degli isolati, molti dei quali appartenenti alla specie *E. faecium*, era resistente ad uno o più antibiotici. Tuttavia, l'analisi genetica dei ceppi di *E. faecium* isolati dai bivalvi indicava un'elevata diversità a dimostrazione della diversa origine dei ceppi, non necessariamente correlata alla contaminazione da liquami dell'ambiente marino. La maggior parte degli isolati mostrava similarità con ceppi umani o animali ma pochi erano correlati a ceppi appartenenti a cloni epidemici o coinvolti in infezioni umane.

1.6 Mitili



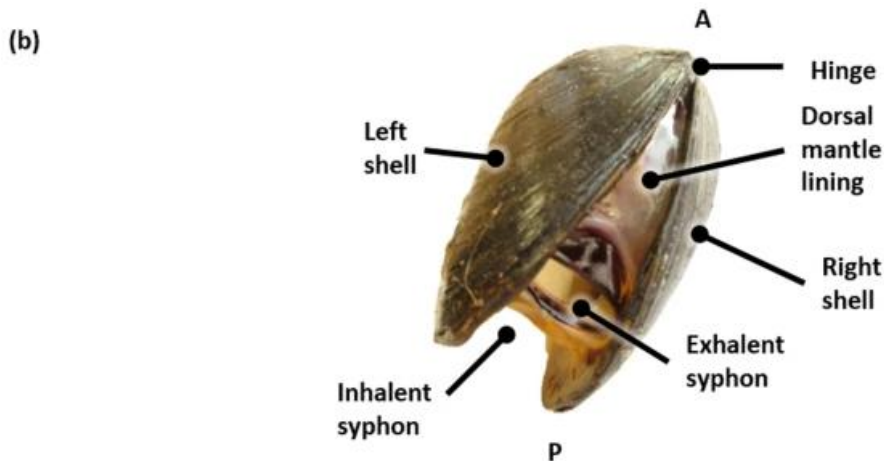


Figura 7. Anatomia generale dei mitili (*Mytilus edulis*). a) Vista ventrale dopo taglio dei muscoli adduttori e apertura forzata delle valve. b) Vista dorsale obliqua. Abbreviazioni: L=sinistra, R=destra; P=posteriore; A=anteriore. (Eggermont et al., 2020)

I mitili (*Mytilus spp.*) (Figura 7) sono organismi acquatici appartenenti al phylum dei molluschi e alla classe dei bivalvi (Cattaneo & Bernardi, 2010); la loro importanza è legata al fatto che sono stati tra i primi animali ad essere utilizzati come organismi sentinella per il monitoraggio della qualità delle acque costiere in termini di inquinanti derivanti dall'attività antropica.

Si tratta di organismi sessili (possono fornire informazioni sulla zona in cui vengono raccolti), di medie dimensioni (un individuo può fornire materiale tissutale sufficiente per le analisi), inoltre si ritrovano in acque poco profonde e ciò rende semplice la loro raccolta. Sono creature resistenti e quindi adatte a studi ecotossicologici e microbiologici di laboratorio.

Si nutrono principalmente di fitoplancton ma in condizioni di necessità possono sfruttare anche altre fonti di nutrimento come i batteri. Ogni mitilo filtra le particelle sospese dall'acqua marina per mezzo delle branchie ciliate e in condizioni di eccesso di nutrienti, continua la filtrazione alla massima efficienza e, infine, elimina i residui del metabolismo tramite pseudofeci che sono composte da muco e particelle non digerite. Durante l'alimentazione attiva la velocità di filtrazione di un adulto è di circa 50 ml al minuto (3 L all'ora) (Beyer et al., 2017).

L'alimento introdotto con l'acqua dal sifone inalante viene intrappolato nel muco delle branchie e convogliato dalle ciglia verso la bocca; i palpi labiali selezionano il materiale da introdurre nel tratto digerente e il resto viene eliminato tramite il sifone esalante (Cattaneo & Bernardi, 2010).

L'intensa attività di filtrazione determina l'accumulo di eventuali microrganismi e di tossine all'interno dei tessuti di questi molluschi ed è per questo che rappresentano un rischio per la salute umana quando vengono consumati crudi o poco cotti (Marino et al., 2005).

Il genere *Mytilus* comprende numerose specie strettamente imparentate che possono incrociarsi tra loro per dare degli ibridi fertili. Una delle specie più

importanti da un punto di vista ecologico ed economico è *Mytilus galloprovincialis*. (Beyer et al., 2017; Burgos-Aceves & Faggio, 2017).

1.6-1 Mytilus galloprovincialis



Figura 8. Tre prospettive di Mytilus galloprovincialis. (<https://www.ilgiornaledeimarinai.it>)

M. galloprovincialis (Lamarck 1819) (Figura 8) è un mollusco bivalve, equivalve che abita le zone rocciose intertidali e le zone subtidali poco profonde. È la specie maggiormente diffusa e si ritrova ormai in tutti i continenti; tuttavia, è considerata endemica del Mar Mediterraneo e di parti della costa dell'Oceano Atlantico nordoccidentale; per tale motivo è conosciuta anche come **mitilo mediterraneo**.

È considerata una delle 100 specie più invasive del mondo. Nell'ultimo secolo ha colonizzato infatti gli habitat marini costieri di entrambi gli emisferi comprese le località di Hong Kong, Giappone, la costa occidentale del Nord

America, Sudafrica, parti dell’Australia, Nuova Zelanda e Sudamerica. (Oyarzún et al., 2024).

1.6-2 Tolleranza di *M. galloprovincialis* alle infezioni batteriche

Come organismi filtratori, i molluschi bivalvi sono costantemente esposti a molteplici microrganismi patogeni e/o opportunisti naturalmente presenti nelle comunità microbiche degli ambienti acquatici (Antunes et al., 2014). Questo spiegherebbe la notevole suscettibilità dei bivalvi a numerose infezioni che ne compromettono l’allevamento causando importanti perdite economiche in tutto il mondo (Figueras et al., 2019).

Contrariamente ad altre specie di bivalvi, *M. galloprovincialis* si caratterizza per essere altamente resistente alle infezioni da parte di batteri patogeni, in quanto negli ambienti naturali sono stati segnalati solo sporadici casi di mortalità di massa, a differenza di quanto accade per altre specie di bivalvi che condividono ecosistemi simili, come le vongole (*Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum*) e le ostriche (*Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*) (Panebianco et al., 2023).

Si ritiene che la tolleranza alle infezioni batteriche mostrata da *M. galloprovincialis* sia legata allo sviluppo di un sistema immunitario innato complesso ed efficiente, le cui componenti cellulari e molecolari sono oggetto

di studi (Figueras et al., 2019). La maggior parte di questi studi sono condotti sull'emolinfa che viene solitamente prelevata dal muscolo adduttore posteriore con l'ausilio di una siringa (Panebianco et al., 2023).

I meccanismi di difesa finalizzati all'eliminazione di batteri invasori, si basano su una complessa interazione tra risposte immunitarie cellulari e umorali. Il sistema immunitario cellulare si basa sulla presenza degli emociti, cellule immunocompetenti che nei bivalvi possono essere distinte in tre tipologie: granulociti, ialinociti e agranulociti che nel complesso sono coinvolti nei processi infiammatori, nella riparazione di danni tissutali, fagocitosi e incapsulamento di particelle estranee. Inoltre, i fattori umorali rilasciati dagli emociti possono contribuire all'attività battericida; essi includono enzimi idrolitici come il lisozima, che può agire direttamente lisando le cellule batteriche o indirettamente aumentando l'attività di altre molecole antibatteriche, radicali liberi dell'ossigeno o dell'azoto (Antunes et al., 2014; Figueras et al., 2019). Negli emociti di mitilo, quasi la metà dei geni espressi codifica per peptidi antimicrobici (AMP): miticine, mitiline e mitimicine sono i più rappresentati (Figueras et al., 2019). Queste molecole mostrano un'elevata diversità genetica e oltre all'attività antivirale e antibatterica, sono coinvolte anche nella rigenerazione tissutale (Panebianco et al., 2023).

L'identificazione dei peptidi antimicrobici nei molluschi bivalvi risale all'inizio degli anni 2000, parallelamente allo sviluppo di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS). A differenza di altre specie di bivalvi in cui queste molecole sono state descritte, è stata segnalata una loro notevole abbondanza in *M. galloprovincialis* e questo potrebbe spiegare la notevole resistenza alle infezioni batteriche di questa specie e quindi il suo successo evolutivo (Figueras et al., 2019).

1.6-3 Resistenza dei microrganismi all'attività battericida dell'emolinfa

Differenti studi supportano l'ipotesi che la persistenza dei batteri nei tessuti dei bivalvi dipenda, almeno in parte, dalla loro capacità di resistere all'attività battericida dell'emolinfa. Nello specifico è stato ipotizzato che differenti interazioni tra emociti e molecole solubili dell'emolinfa possano essere responsabili della persistenza di alcuni batteri all'interno dei tessuti dei bivalvi. Risposte differenziali in termini di espressione genica degli emociti, clearance batterica, conta totale e differenziale degli emociti, recentemente riportate in specie di bivalvi esposti a batteri patogeni e non, supportano l'idea dell'esistenza di interazioni specifiche tra componenti dell'emolinfa e diversi microrganismi (Ciacci et al., 2009). Le diverse specie batteriche mostrano una sensibilità diversa all'azione dell'emolinfa dei bivalvi e le potenziali strategie

utilizzate dai batteri per eludere l'uccisione fagocitaria da parte degli emociti sono diverse. Esperimenti *in vitro* sul potere antibatterico dell'emolinfa di un mollusco di acqua dolce (*Anodonta cygnea*) nei confronti di *E. coli* ed enterococchi dimostrava che soprattutto gli emociti erano coinvolti nell'eliminazione dei batteri e che *E. coli* era più resistente degli enterococchi (Antunes et al., 2014). I batteri possono resistere all'azione fagocitica degli emociti in vario modo, per esempio diverse specie di *Vibrio spp.* resistono grazie alla produzione di una capsula che inibisce sia il contatto tra emociti e cellula batterica sia la deposizione di opsonine e l'azione degli enzimi litici sulle molecole batteriche superficiali. Anche la presenza sulla superficie batterica di specifici zuccheri o la produzione di sostanze tossiche da parte del batterio può aiutare la sopravvivenza nei tessuti dei bivalvi. Inoltre, i batteri possono sfuggire al killing degli emociti impedendo il burst ossidativo associato alla fagocitosi, per esempio attraverso la produzione di catalasi (Canesi et al 2002). In generale non sono ancora del tutto chiari i motivi per cui certi batteri sono più sensibili di altri all'attività battericida degli emociti dei bivalvi. Dai dati disponibili è chiaro che diverse questioni necessitano di ulteriori indagini; la spiegazione dei fattori che influenzano la fagocitosi nei bivalvi e le strategie fondamentali utilizzate dai batteri per sfuggire all'uccisione dell'emolinfa sono importanti non solo per comprendere le difese

immunitarie dei bivalvi, ma anche per spiegare la persistenza dei batteri patogeni nei tessuti dei bivalvi e per prevedere il conseguente impatto sulla salute umana.

2. SCOPO DELLA TESI

L'introduzione degli antibiotici nella pratica clinica ha certamente rappresentato uno dei più importanti traguardi nel campo della medicina ma allo stesso tempo ha sollevato il grande problema della diffusione di microrganismi antibiotico-resistenti, i quali vengono ormai isolati, non solo in ambiente nosocomiale ma sempre più spesso anche negli ambienti naturali come quello marino. Nello specifico, le aree costiere, fortemente impattate dalle attività antropiche rappresentano un importante reservoir di batteri intestinali (a causa di episodi di contaminazione fecale) che potrebbero veicolare geni di antibiotico-resistenza, i quali vengono facilmente trasferiti tra i microrganismi mediante meccanismi di trasferimento genetico orizzontale (HGT). In questo lavoro di tesi, è stata posta particolare attenzione al ruolo dei mitili che per la loro natura di organismi filtratori, possono concentrare all'interno dei propri tessuti batteri antibiotico-resistenti e creare condizioni favorevoli per processi di trasferimento genetico.

In particolare, lo scopo della tesi è stato quello di valutare la trasferibilità di geni di antibiotico resistenza all'interno dei tessuti di mitili della specie *M. galloprovincialis*, tra ceppi del genere *Enterococcus spp* resistenti agli oxazolidinoni, isolati dal sedimento marino e dallo zooplancton.

A tal proposito, sono stati allestiti saggi di coniugazione *in vitro* e *in vivo* in diverse condizioni sperimentali, tra cui la presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico per valutare quanto queste potessero influenzare la frequenza di coniugazione. Inoltre, sono stati allestiti saggi di coniugazione *in vivo* e *in vitro* in emolinfa per valutare se gli scambi genetici potessero essere limitati dal sistema immunitario dell'animale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici

Nel presente studio sono stati utilizzati ceppi batterici appartenenti alla collezione del Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) dell'Università Politecnica delle Marche:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: utilizzato come ceppo di riferimento nei test di sensibilità agli antibiotici.
- *Enterococcus faecium* 64/3: ceppo ottenuto in laboratorio, reso resistente a rifampicina e acido fusidico per mutazione indotta da ripetuti passaggi su terreno selettivo addizionato dei suddetti antibiotici. Utilizzato nei saggi di coniugazione come ceppo **ricevente**.
- *Enterococcus faecium* LSEF2: ceppo resistente al florfenicolo grazie al gene *poxtA*, isolato da sedimento durante una campagna di campionamento lungo la costa adriatica, in prossimità della foce del fiume Esino, nell'ambito di un precedente progetto di ricerca. Il gene di resistenza *poxtA* è localizzato su più plasmidi, tra cui un plasmide coniugativo di 27,703 bp caratterizzato da Fioriti et al. (2021). *E. faecium* LSEF2 è stato utilizzato come **donatore** negli esperimenti di coniugazione effettuati in questo lavoro.

3.2 Terreni di coltura

- **Brain Heart Infusion Broth (BHIB) e Brain Heart Infusion agar (BHIA):** sono terreni di coltura d'uso generale particolarmente ricchi, ampiamente utilizzati per la crescita e il mantenimento di una varietà di microrganismi esigenti, tra cui batteri patogeni aerobi e anaerobi, lieviti e funghi. Contengono tipicamente, infuso di cuore di manzo o maiale e cervello di vitello, una fonte di amminoacidi (gelatina digerita o altro tessuto animale), cloruro di sodio per il mantenimento dell'equilibrio osmotico, sodio fosfato bibasico come sistema tampone e glucosio come fonte di zuccheri. In questo lavoro, sono stati usati per la crescita dei ceppi donatore e ricevente per gli esperimenti di coniugazione.
- **MacConkey agar:** è un terreno solido selettivo e differenziale utilizzato per l'isolamento di batteri Gram-negativi e batteri enterici. Contiene, infatti, sali biliari e cristalvioletto che impediscono la crescita dei batteri Gram-positivi (e alcuni Gram negativi più esigenti), lattosio come unica fonte di carboidrati e rosso neutro come indicatore di pH che vira al rosso per valori al di sotto di 6.8. I batteri fermentanti il lattosio crescono sottoforma di colonie con diverse sfumature di rosso poiché producono acidi misti come conseguenza del processo fermentativo, determinando un abbassamento del pH. I batteri non fermentanti formano colonie

trasparenti o incolori. Questo consente di differenziare i batteri enterici patogeni (non fermentanti) dai non patogeni (come *E. coli*). Questo terreno è stato utilizzato per escludere la presenza di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* nei mitili utilizzati nello studio.

- **Marine agar:** è impiegato per l'isolamento, la crescita e il mantenimento di un'ampia varietà di batteri marini eterotrofi. La composizione di questo terreno mima l'ambiente marino per cui è molto ricco di sali minerali e contiene anche peptoni ed estratto di lievito.
- **Slanetz-Bartley:** è un terreno selettivo utilizzato per l'isolamento e la conta degli enterococchi da campioni clinici e ambientali. Contiene triptosio (miscela di proteine idrolizzate con tripsina) che fornisce amminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali, estratto di lievito come fonte di vitamine del gruppo B, glucosio come zucchero fermentabile, fosfato di potassio bibasico come sistema tampone. È presente sodio azide come agente selettivo (per inibire la crescita di batteri Gram-negativi) e TTC (trifenil tetrazolio cloruro) all'1% come indicatore di crescita: alcune specie di enterococchi riducono questo composto a trifenilformazano insolubile che precipitando nel terreno conferisce alle colonie una colorazione rosso-viola. È stato utilizzato nel

presente lavoro per valutare la presenza di eventuali enterococchi nei mitili utilizzati nello studio.

- **Slanetz Bartley + Florfenicolo (10 µg/ml):** utilizzato per l'isolamento del ceppo donatore LSEF2, resistente al florfenicolo per la presenza del gene *poxA*.
- **Slanetz Bartley + Rifampicina (25 µg/ml) + Acido fusidico (25 µg/ml):** utilizzato per l'isolamento del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3 resistente a rifampicina e acido fusidico.
- **Slanetz Bartley + Florfenicolo (10 µg/ml) + Acido fusidico (25 µg/ml) + Rifampicina (25 µg/ml):** utilizzato per l'isolamento dei transconiuganti che dovrebbero essere resistenti a rifampicina e acido fusidico (come il ceppo ricevente) e al florfenicolo in seguito all'acquisizione del plasmide contenente il gene *poxA*.
- **Mueller-Hinton II broth:** è un terreno universale addizionato di calcio (20-25 mg/l) e magnesio (10-12,5 mg/l) consigliato dal CLSI e dall'EUCAST per i test di sensibilità agli antibiotici. In questo lavoro è stato utilizzato per la determinazione della MIC (minima concentrazione inibente) con il metodo delle microdiluizioni in brodo. Contiene estratto di carne, idrolizzato acido di caseina e amido.

3.3 Fase di depurazione dei mitili

Prima di procedere ai saggi di coniugazione è stata attuata una fase di depurazione dei mitili per eliminare eventuali batteri presenti nei tessuti. Essi sono stati stabulati in numero di circa 30 esemplari all'interno di un acquario preventivamente lavato con acqua e sapone e igienizzato con alcol etilico al 70%. All'interno della vasca sono stati aggiunti circa 20 L di acqua marina sintetica (ASW) (NaCl ~ 35%) precedentemente preparati in bottiglie da 1 L che sono state sottoposte ad un programma di sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti). Dopo la fase di sterilizzazione, l'acqua di mare è stata lasciata a temperatura ambiente per consentirne il raffreddamento; le bottiglie sono state agitate per permettere la risospensione di eventuali depositi di sale e poi versate all'interno dell'acquario. Sono stati inseriti degli aeratori per garantire un adeguato apporto di ossigeno. La vasca è stata coperta con una lastra di plexiglass per evitare contaminazioni ed un'eccessiva evaporazione. Gli esemplari sono stati lasciati per due settimane all'interno dell'acquario posto in *water table* ad una temperatura costante di 20°C, cambiando l'acqua due volte a settimana. (Figura 9).

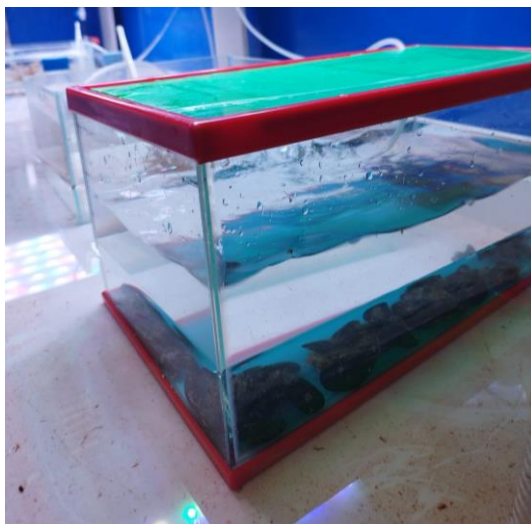


Figura 9. Depurazione dei mitili (foto di F. Carriera, 2024)

Per verificare l'assenza di microrganismi potenzialmente interferenti con i successivi esperimenti di coniugazione, due mitili sono stati sacrificati ad ogni cambio dell'acqua: la superficie del guscio è stata igienizzata con alcol etilico e successivamente, utilizzando un bisturi sterile, è stata praticata un'incisione tra le due valve, partendo dalla porzione anteriore fino ad arrivare ai muscoli adduttori. Dopo il taglio dei muscoli adduttori, le due valve vengono separate delicatamente e i tessuti interni prelevati e depositati all'interno di una busta sterile da stomacher. Dopo aver pesato i corpi dei molluschi, questi sono stati omogenati in soluzione fisiologica sterile (NaCl 9%) aggiunta in proporzione al peso (90 ml di soluzione fisiologica per 10 g di tessuto). Utilizzando un potter i tessuti sono stati sminuzzati e l'omogenato centrifugato (7.000g per 5 min) (*Figura 10*); il pellet è stato risospeso in 3 ml di soluzione fisiologica.

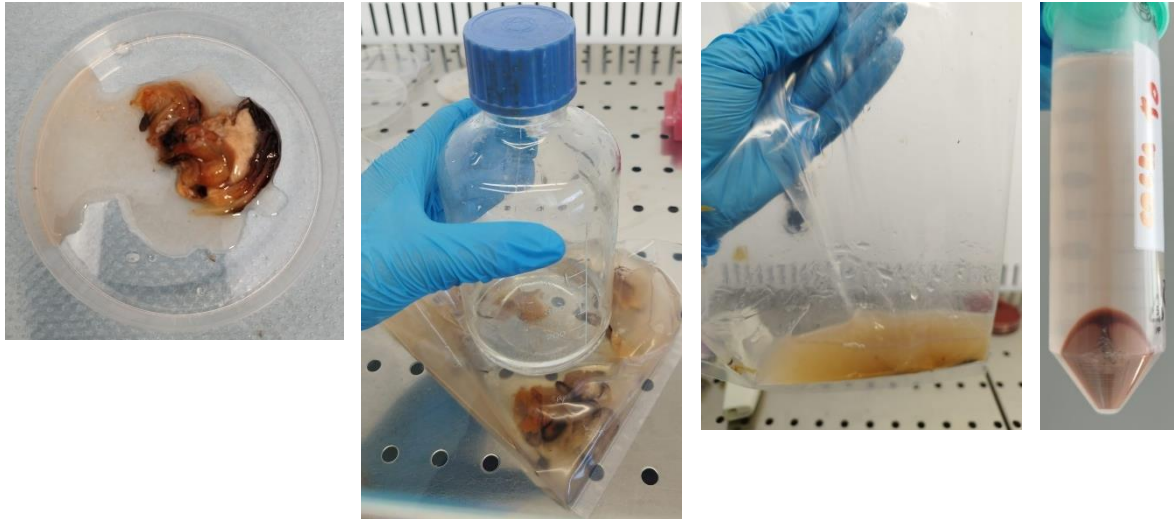


Figura 10. Omogenizzazione dei corpi dei molluschi. (Foto di F. Carriera, 2024)

Successivamente aliquote di 0,5 ml sono state piastrate per spatolamento sui seguenti terreni agarizzati:

- MacConkey (MC): per la ricerca di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.
- Slanetz-Bartley (SB): per la ricerca di enterococchi.
- Marine agar (MA): per la ricerca di eventuali microrganismi marini.

Le piastre sono state incubate in termostato a 37° per 24 ore. Dopo incubazione, l'assenza di crescita batterica sui terreni utilizzati permetteva di proseguire con i saggi di coniugazione successivi.

3.4 Saggi di coniugazione in vivo

Dopo la fase di depurazione, i molluschi sono stati prelevati dall'acquario con un mestolo sterile e inseriti all'interno di 4 becher precedentemente autoclavati. Ogni becher, adagiato all'interno di *water table* mantenuti ad una temperatura costante di 20°C, conteneva 5 litri di ASW sterile, 5 esemplari e un aeratore per apportare ossigeno all'ambiente.

È stata testata la capacità dei ceppi *E. faecium* LSEF2 (donatore) e 64/3 (ricevente) di coniugare in due diverse condizioni sperimentali:

- condizione 1: inoculo dei ceppi nell'acqua di mare sintetica (becher 1 e 2)
- condizione 2: iniezione dei ceppi all'interno del muscolo adduttore dei molluschi (becher 3 e 4) (Figura 11).

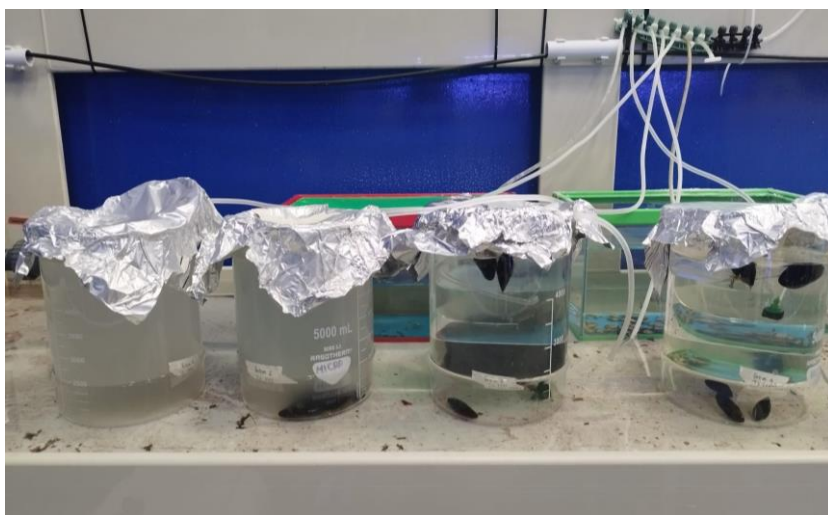


Figura 11. Sistema di coniugazione in vivo. (foto di F. Carriera, 2024)

Sono stati testati due tempi per ogni condizione ($T_1 = 1$ ora di esposizione e $T_2 = 24$ ore di esposizione). I becher 1 e 3 sono stati utilizzati per il T_1 e i becher 2 e 4 per il T_2 .

Per testare la condizione 1 gli inoculi sono stati preparati il giorno precedente a partire da colture overnight a temperatura ambiente. Sono stati preparati 200 ml di brodocoltura (BHI brodo) di *E. faecium* LSEF2 (donatore) e 400 ml di brodocoltura di *E. faecium* 64/3 (ricevente) in doppio per inoculare i becher 1 e 2. Il giorno seguente la crescita è stata monitorata effettuando letture allo spettrofotometro ($\lambda = 650$ nm), le brodocolture sono state centrifugate (10.000 g per 10 minuti) e i pellet risospesi in acqua di mare sterile (50 ml).

Anche per testare la condizione 2 gli inoculi sono stati preparati il giorno precedente a partire da colture overnight a temperatura ambiente. Per entrambi i ceppi (donatore e ricevente) sono stati preparati 5 ml di brodocoltura (BHI brodo) in doppio. Il giorno seguente sono state effettuate letture allo spettrofotometro ($\lambda = 650$ nm) per monitorare la crescita; le brodocolture sono state centrifugate (10.000 g per 10 minuti) e i pellet risospesi in 1 ml di PBS (phosphate-buffer saline) sterile. I pellet del ceppo donatore e del ceppo ricevente sono stati uniti in rapporto 1:1 (1 ml di donatore + 1 ml ricevente). 50 μ L del mix sono stati iniettati all'interno del muscolo adduttore di 5 esemplari utilizzando una siringa sterile monouso (*Figura 12*). L'iniezione viene eseguita

forzando leggermente l'apertura delle valve, la siringa viene posizionata a 45° e inserita nel muscolo adduttore; dopo l'iniezione sono stati inseriti 5 esemplari per becher.



Figura 12. Iniezione nel muscolo adduttore. (Foto di F. Carriera, 2024)

In seguito, è stata valutata la concentrazione di partenza (T_0) del ceppo donatore e ricevente (UFC/ml):

- per la condizione 1 (becher 1 e 2): sono state prelevate delle aliquote di acqua da ognuno dei becher, sono state eseguite delle diluzioni scalari in base 10 e successivamente sono state piastrate in spot da 10 μL sui rispettivi terreni selettivi;
- per la condizione 2 (becher 3 e 4): è stato immediatamente prelevato un campione di emolinfa da un mollusco, il quale è stato opportunamente diluito e piastrato in spot da 10 μL sugli appositi terreni selettivi.

Successivamente, dopo 1 ora dall'inoculo (T_1) dai becher 1 e 3 è stata prelevata un'aliquota di acqua in cui è stata valutata la concentrazione del donatore e ricevente e la presenza di eventuali transconiuganti.

I 5 esemplari del becher 1 sono stati sacrificati come già riportato nel paragrafo 3.3 per valutare il bioaccumulo dei ceppi donatore e ricevente e la presenza di transconiuganti.

Inoltre, prima di sacrificare i 5 esemplari del becher 3, da ognuno è stata prelevata l'emolinfa con una siringa sterile, forzando delicatamente l'apertura delle valve e mantenendole separate inserendo nella fessura un puntale sterile (*Figura 13*).

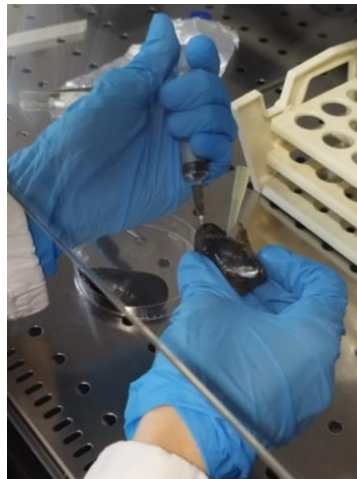


Figura 13. Prelievo di emolinfa dal muscolo adduttore. (Foto di F. Carriera, 2024)

In seguito, sono state effettuate delle diluizioni seriali che sono state piastrate per la conta del donatore e del ricevente; per la ricerca dei transconiuganti sono stati piastrati 500 μ L del campione non diluito. I corpi dei molluschi sono stati trattati come descritto per il becher 1.

Lo stesso procedimento è stato svolto dopo 24 ore di esposizione (T_2) utilizzando i campioni prelevati dai becher 2 e 4.

Le piastre sono state incubate in termostato a 37°C per 24 ore.

L'esperimento di coniugazione *in vivo* iniettando nel muscolo adduttore i ceppi di *E. faecium* LSEF2 (donatore) e 64/3 (ricevente) è stato ripetuto, aumentando la concentrazione di partenza dei due ceppi; in questo caso sono stati preparati gli inoculi a partire da colture overnight a temperatura ambiente: 100 ml di brodocoltura (BHI brodo) dei due ceppi (in doppio).

La frequenza di coniugazione (F) per ogni esperimento è stata calcolata secondo la formula:

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

Sono stati effettuati almeno tre passaggi consecutivi dei transconiuganti su Slanetz-Bartley + Florfenicolo (10 μ g/ml) + Acido fusidico (25 μ g/ml) +

Rifampicina (25 µg/ml) ed alcuni di essi sono stati selezionati per l'analisi genotipica e fenotipica.

3.5 Saggi di coniugazione in vitro in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

Per gli esperimenti di coniugazione *in vitro* è stata utilizzata la tecnica di coniugazione su filtro (Jutkina et al., 2016) valutando il trasferimento della resistenza al florfenicolo. Sono state allestite delle brodocolture overnight dei ceppi donatori e riceventi in 5 ml di BHI brodo e successivamente è stato eseguito il sub-inoculo dei ceppi in 10 ml di BHI brodo. I ceppi sono stati lasciati in incubazione a 37°C per 4 ore in bagno agitato per ottenere una crescita in fase logaritmica. Le brodocolture del donatore e ricevente sono state unite in rapporto 1:1 e in seguito è stato montato l'apparato di filtrazione, precedentemente sterilizzato (filtri di diametro 4,7 mm, con pori di 0,22µm). A questo punto è stata eseguita la filtrazione della brodocoltura contenente il mix donatore/ricevente su più filtri in modo da posizionare ciascun filtro su piastre di BH con concentrazioni diverse di florfenicolo (0,12 -50 µg/ml). Le piastre sono state incubate overnight in termostato a 37°C e successivamente i filtri prelevati e inseriti all'interno di una falcon contenente 10 ml di soluzione fisiologica sterile. Le falcon sono state vortexate per permettere la risospensione della patina microbica presente sul

filtro, il quale è stato poi eliminato e la sospensione trasferita in una provetta sterile da 15 ml. È stata eseguita una centrifuga (10.000 g per 10 minuti), il sovranatante è stato eliminato e il pellet (costituito dalle cellule batteriche) è stato risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. A questo punto sono state allestite diluizioni seriali (1:10) in soluzione fisiologica sterile che successivamente sono state piastrate per spatolamento sugli appositi terreni contenenti gli antibiotici per la selezione del donatore, del ricevente e degli eventuali transconiuganti. In particolare, sono state preparate piastre contenenti 10µg/ml di florfenicolo (FFC) per selezionare il donatore, piastre contenenti 25µg/ml di rifampicina (RIFA) e 25µg/ml di acido fusidico (FUS) per la selezione del ricevente e piastre contenenti tutti e tre gli antibiotici, alle stesse concentrazioni, per la selezione dei transconiuganti. Una volta ottenuti gli eventuali transconiuganti, la frequenza di trasferimento per cellula ricevente è stata calcolata con la seguente formula:

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

3.6 Saggi di coniugazione in vivo in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

Sono stati allestiti 3 becher contenenti ognuno 5 litri di ASW sterile e 5 molluschi. In ciascuno è stato inserito un aeratore per consentire un continuo apporto di ossigeno al sistema. I becher sono stati posizionati all'interno di *water table* mantenuti ad una temperatura controllata di 20°C (*Figura 14*).



Figura 14. Sistema di coniugazione in vivo (Foto di F. Carriera, 2024)

L'esperimento è stato eseguito testando la capacità di ceppi di *E. faecium* LSEF2 (donatore) e 64/3 (ricevente) di coniugare in diverse condizioni:

- condizione 1: assenza di florfenicolo in acqua (controllo positivo)
- condizione 2: presenza in acqua di florfenicolo ad una concentrazione sub-mic di 0,12 µg/ml

- condizione 3: presenza in acqua di florfenicolo ad una concentrazione sub-mic di 1 µg/ml.

Per ogni condizione, l'eventuale coniugazione è stata testata dopo 24 ore di esposizione.

Gli inoculi dei ceppi donatore e ricevente sono stati preparati come descritto per la condizione 1 del precedente esperimento di coniugazione *in vivo*.

Immediatamente dopo aver inoculato i ceppi e aver aggiunto l'opportuna quantità di antibiotico ai sistemi, sono state prelevate aliquote di acqua da ciascun becher per la valutazione della concentrazione di partenza dei due ceppi (T₀).

Dopo 24 ore, sono state prelevate dai becher aliquote di acqua per la conta dei ceppi donatore e ricevente e per la ricerca dei transconiuganti. Per lo stesso scopo i 5 esemplari di ciascun becher sono stati sacrificati e i corpi omogenati in 100 ml di soluzione fisiologica. I campioni sono stati trattati come descritto per la condizione 1 dell'esperimento di coniugazione *in vivo* precedente.

3.7 Saggi di coniugazione in vitro in emolinfa in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

L'esperimento è stato eseguito con lo scopo di valutare la capacità di ceppi di *E. faecium* LSEF2 (donatore) e 64/3 (ricevente) di coniugare all'interno dell'emolinfa estratta da molluschi stabulati in ASW sterile in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico. Sono state testate le seguenti condizioni:

- condizione 1: assenza di florfenicolo (controllo positivo)
- condizione 2: presenza in emolinfa di florfenicolo ad una concentrazione sub-mic di 0,12 µg/ml
- condizione 3: presenza in emolinfa di florfenicolo ad una concentrazione sub-mic di 1 µg/ml

Per ogni condizione, l'eventuale coniugazione è stata testata a diversi tempi di esposizione: 30 minuti (T₁), 1 ora (T₂), 2 ore (T₃), 4 ore (T₄) e 24 ore (T₅).

Gli inoculi dei ceppi donatore e ricevente sono stati preparati il giorno precedente in 20 ml di BHI brodo e incubati overnight a 37°C in termostato. Il giorno successivo sono state eseguite le letture allo spettrofotometro ($\lambda=650$ nm); le brodoculture sono state centrifugate (10.000 g per 10 minuti) e i pellet risospesi in 4,5 ml di emolinfa (precedentemente estratta). È stato preparato un

mix per ognuna delle tre condizioni testate, unendo 1,5 ml del ceppo donatore + 1,5 ml del ceppo ricevente (per un totale di 3 ml). Per le condizioni che prevedono la presenza dell'antibiotico si aggiungono anche i rispettivi volumi di florfenicolo, nello specifico:

- per la condizione 2: è stato aggiunto un volume pari a 3,6 μL partendo da una diluizione 1:100 dello stock (10.000 $\mu\text{g/ml}$).
- per la condizione 3: è stato aggiunto un volume di 3 μL partendo da una diluizione 1:10 dello stock.

A questo punto è stata allestita una piastra multiwell da 24 pozzetti (*Figura 15*): per ogni condizione (righe) e ogni tempo (colonne) testati sono stati aggiunti 500 μL di emolinfa contenente entrambi i ceppi all'interno dei pozzetti. La piastra è stata incubata in termostato a 18°C.

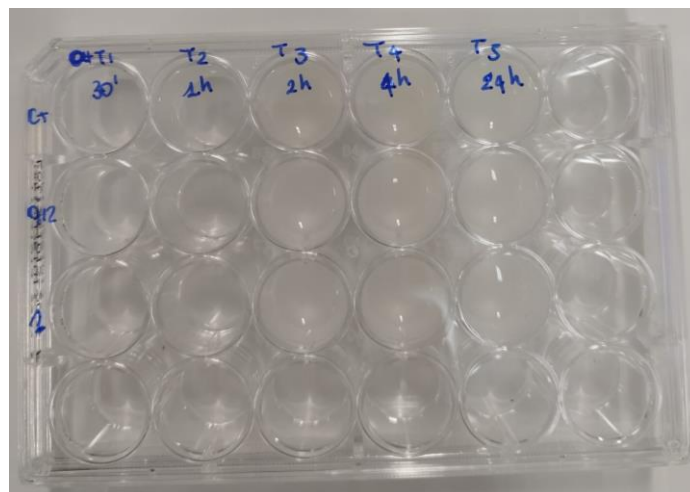


Figura 15. Piastra multiwell allestita per la coniugazione in emolinfa (Foto di F. Carriera, 2024)

Prima di incubare la piastra, è stata valutata la concentrazione di partenza (T_0) dei ceppi donatore e ricevente (CFU/ml) prelevando un'aliquota di emolinfa da ciascun pozzetto della prima colonna. Sono state effettuate delle diluizioni e piastrate in spot da 10 μ L sui rispettivi terreni selettivi.

Ad ogni tempo esaminato e per ogni condizione, sono state poi prelevate delle aliquote di emolinfa dalla piastra sia per la conta del donatore e del ricevente (diluizioni piastrate in spot da 10 μ L) che per la ricerca dei transconiuganti. In questo caso sono stati piastrati sull'apposito terreno selettivo 400 μ L del campione non diluito e 100 μ L del campione diluito 1:10.

Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore.

3.8 Caratterizzazione genotipica dei ceppi transconiuganti

La caratterizzazione genotipica dei transconiuganti è stata effettuata mediante:

- **saggi di PCR** per confermare l'acquisizione del gene *poxA*
- **PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)** per confermare la veridicità dei transconiuganti confrontando i profili ottenuti in seguito alla restrizione con gli enzimi **SmaI** che consente di ottenere un profilo di restrizione dei transconiuganti da confrontare con quelli dei ceppi donatore e ricevente e con l'enzima **S1** che permette di definire il

numero e la dimensione dei plasmidi presenti nel ceppo donatore e verificare la loro presenza nei transconiuganti.

3.8-1 Estrazione del DNA totale batterico

Prima di procedere con i saggi di PCR, è stata eseguita l'estrazione del DNA totale batterico utilizzando il kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma). I ceppi batterici sono stati inoculati in BHI brodo (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37°C; le brodoculture sono state centrifugate (13.000 g per 2 minuti), il pellet risospeso in 200 µL di Lysozime Solution contenente lisozima (Sigma) alla concentrazione finale di 45 mg/ml e incubato a 37°C per 1 ora. Successivamente sono stati aggiunti 200 µL di Lysis Solution e 20 µL di Proteinasi K (20 mg/ml) (Sigma) per la digestione delle proteine. I campioni sono stati poi mantenuti a 55°C per 10 minuti. Dopo la sospensione, sono stati aggiunti 200 µL di etanolo assoluto, i campioni sono stati mescolati per inversione e trasferiti all'interno di apposite colonnine inserite in eppendorf da 1,5 ml e centrifugate (6.500 g per 1 minuto). Dopo aver eliminato l'eluato è stato effettuato un primo lavaggio con 500 µL di Wash Solution e poi una centrifuga (6.500 g per 1 minuto) ed un secondo lavaggio seguito da un'ulteriore centrifuga (12.000 g per 3 minuti). Le colonnine sono state trasferite in nuove eppendorf a cui sono stati aggiunti 200 µL di Elution

Solution ed è stata eseguita una centrifuga (6.500 g per 1 minuto) e poi una seconda eluizione. La soluzione di DNA è stata conservata a -20°C.

3.8-2 Saggi di PCR

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente di ottenere rapidamente da milioni a miliardi di copie di una specifica regione del DNA di cui si conosce la sequenza nucleotidica. La reazione di PCR avviene all'interno di una miscela che contiene vari reagenti: il template di DNA, ossia la regione target del DNA da amplificare, una DNA polimerasi termostabile, desossiribonucleosidi trifosfati (dNTPs), due primers che si legano ciascuno su un filamento a un estremo della regione da amplificare e un buffer contenente cationi bivalenti.

Per l'amplificazione dei geni di resistenza degli enterococchi, la miscela di reazione utilizzata è composta come riportato in *Tabella 1*.

Reagenti mix (Concentrazioni iniziali)	Volume μl utilizzati (Concentrazione finale)
H ₂ O	18.5
PCR Buffer (10X)	2.5 (1X)
dNTPs (10mM)	0.5 (0.2 mM)
Primer Forward (100 μ M)	0.15 (0.6 μM)
Primer Reverse (100 μ M)	0.15 (0.6 μM)
Dream Taq (5U/ μ L)	0.2 (1U)
Estratto di DNA	3

Tabella 1. Miscela di reazione per saggi di PCR

I campioni vengono inseriti all'interno di un termociclatore (MiniAmp Plus Thermal Cycler) dove saranno sottoposti alla reazione di PCR in cui si possono distinguere tre fasi:

- *fase di denaturazione*: la temperatura è di circa 94°C e consente la separazione dei filamenti di DNA;
- *fase di annealing*: la temperatura raggiunge circa 50-65°C per favorire l'associazione specifica dei primers alla regione di interesse;

➤ *fase di estensione*: la temperatura è di circa 65-72°C ed è quella ottimale per l'attività della Taq polimerasi che estende i primer utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Questo ciclo viene ripetuto circa 30-40 volte. I saggi di PCR effettuati in questo lavoro sono stati eseguiti utilizzando DreamTaq Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). I primers e il programma di amplificazione (Brenciani et al. 2019) per *poxA* sono riportati in *Tabella 2*.

Primer	Sequenza nucleotidica (5'-3')	Lunghezza amplificato	Programma di amplificazione
PoxA FW	gaacgcttgagatatttcgactc	778 bp	95°C x 2min 95°C x30 sec 59°Cx1min 72°Cx1min 72°Cx 10min } x30
PoxA RV	ctggactgagaatacccatc		

Tabella 2. Primers e programma di amplificazione per il gene poxA

Al termine della reazione di PCR gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti ad un'elettroforesi su gel di agarosio. Il gel è stato preparato utilizzando agarosio ad una concentrazione di 1,5% in tampone TAE 1X (Tris-Acetato 40

mM, EDTA 1 mM, pH 8). A questo è stato aggiunto un colorante fluorescente per acidi nucleici (GelRed 1:10). La corsa elettroforetica è stata condotta in TAE 1X applicando una differenza di potenziale di 90 V per circa 1 ora. Come standard di peso molecolare è stato utilizzato GeneRuler 100bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

3.8-3 PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)

La PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) è una tecnica di genotipizzazione utilizzata per la separazione di grandi molecole di DNA genomico in seguito a digestione con enzimi di restrizione. La corsa elettroforetica viene condotta applicando un campo elettrico che varia la direzione in modo periodico.

3.8-3.1 SmaI-PFGE

Si allestisce una coltura overnight in BHI brodo dei ceppi che devono essere sottoposti all'analisi; il giorno successivo viene misurata la OD_{650nm} per determinare la concentrazione di cellule batteriche/ml. In base alla concentrazione si stima il contenuto medio di DNA (µg/ml) e viene centrifugato un volume di coltura (5.000 rpm per 10 minuti) tale da contenere circa 10 µg/ml di DNA per ogni ceppo. Il pellet viene risospeso in 1 ml di tampone TEN (Tris-HCl 10 mM pH7.6, EDTA 10 mM pH8, NaCl 1M). Si esegue una seconda centrifuga (5.000 rpm per 10 minuti), il pellet viene risospeso in 0,5 ml di

tampone TEN e si aggiungono 0,5 ml di Low Melting point agarose (Bio-Rad, Hercules, USA) 1,6% mantenuto ad una temperatura di 50°C. La sospensione batterica mescolata all'agarosio viene distribuita all'interno di stampi "plug mold" (~ 75 µL). Per consentire la solidificazione delle plug, esse vengono lasciate inizialmente a temperatura ambiente e poi poste in frigo a 4°C per 15 minuti. Successivamente, le plug vengono inserite all'interno di provette con 5 ml di soluzione di lisi (contenente 100 µg/ml di lisozima e 50 µg/ml di RNasi A (Sigma)) e poste in incubazione a 37°C per 24 ore. Il giorno successivo, il tampone di lisi viene sostituito da una soluzione di digestione contenente 0,5 mg/ml di proteinasi K e si procede con un'ulteriore incubazione a 50°C per 24-48 ore.

A questo punto, eliminata la soluzione di digestione, viene eseguito un primo lavaggio con 5 ml di acqua distillata per 5 minuti. Successivamente si elimina l'acqua e si eseguono 4 lavaggi della durata di 30 minuti ciascuno in agitazione, con 5 ml di TE buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH8).

In seguito ai lavaggi in TE, si procede alla digestione del DNA: mezza plug di ogni ceppo viene incubata overnight con 30 U di SmaI (ThermoFisher Scientific). La reazione di digestione viene poi bloccata tramite l'aggiunta di 0,5 ml di EDTA 0,5 M pH 8. In seguito, le plug digerite vengono attaccate sull'apposito pettine utilizzando il gel di agarosio 1% (Pulsed Field Certified

Agarose, Bio-Rad) insieme al marker Low Range PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, USA) ed il Lambda PFG Ladder (New England BioLabs, Ipswich, USA). A questo punto si lascia raffreddare e si monta il pettine nell'apposita vaschetta. Infine, viene colato il gel all'interno della vaschetta in modo che le plug si trovino direttamente nei pozzetti creati dal pettine.

Dopo la solidificazione, il gel viene adagiato all'interno della camera elettroforetica in cui viene versato TBE 0,5X Buffer (Tris 0,1 M, acido borico 0,1 M, EDTA 2 mM, pH8). La corsa elettroforetica è stata eseguita tramite l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Biorad) impostando i parametri come indicato in *Tabella 3*.

Gradiente elettrico	6 V/cm
Run time	22 ore
Inclusive angle	120°
Switch iniziale	1 secondi
Switch finale	30 secondi
Ramping factor	linear

Tabella 3. Parametri PFGE dopo digestione con l'enzima SmaI

Terminata la corsa il gel viene immerso in una soluzione acquosa di bromuro di etidio (0,5mg/ml) per circa 30 minuti e poi lavato in acqua distillata. Le bande di DNA vengono quindi visualizzate al trans-illuminatore.

3.8-3.2 S1-PFGE

Il protocollo utilizzato per realizzare le plug è lo stesso descritto nel paragrafo precedente. In questo caso la digestione enzimatica è stata effettuata incubando le plug a temperatura ambiente per 25 minuti con 10U di nucleasi S1 (ThermoFisher Scientific) in un volume finale di 200 µl dello specifico buffer 1X. La corsa elettroforetica viene eseguita utilizzando lo strumento Chef Mapper XA System (Biorad) che viene impostato come segue (*Tabella 4*).

Gradiente elettrico	6 V/cm
Run time	18 ore
Inclusive angle	120°
Switch iniziale	0.5 secondi
Switch finale	22 secondi
Ramping factor	linear

Tabella 4. Parametri PFGE dopo digestione con la nucleasi S1

Al termine della corsa elettroforetica il gel viene immerso in una soluzione acquosa di bromuro di etidio (0,5mg/ml) e in seguito risciacquato in acqua distillata. Il profilo di digestione viene osservato utilizzando un trans-illuminatore.

3.9 Caratterizzazione fenotipica dei ceppi transconiuganti tramite determinazione della MIC

La sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *E. faecium* LSF2 e 64/3 e dei transconiuganti è stata valutata attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo secondo le procedure descritte nel CLSI (CLSI M07-A10- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015). Attraverso questo metodo è possibile determinare la MIC: *Minimal Inhibitory Concentration* che corrisponde alla concentrazione minima di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica visibile *in vitro*. La tecnica prevede innanzitutto l'allestimento di una piastra microtiter da 96 pozzetti in cui verranno testate concentrazioni scalari dell'antibiotico. Utilizzando una micropipetta multicanale, vengono distribuiti 50 μ L di Mueller Hinton II Broth in tutti i pozzetti ad eccezione di quelli della prima colonna, in cui verrà inserita la soluzione di antibiotico che viene preparata diluendo lo stock all'interno di un volume preciso di Mueller Hinton II Broth in modo da avere una concentrazione doppia rispetto alla concentrazione massima che verrà testata. A questo punto 100 μ L della

soluzione di antibiotico vengono dispensati in ogni pozzetto della prima colonna e successivamente si prosegue con le diluizioni scalari dell'antibiotico prelevando 50 µL dai pozzetti della prima colonna e spostandoli nella seconda colonna, si fa lo stesso dalla seconda colonna alla successiva e così fino ai pozzetti della penultima colonna. Nei pozzetti dell'ultima colonna non viene inserito l'antibiotico, in quanto vengono utilizzati come controllo di crescita batterica di ogni ceppo.

Dopo aver allestito la piastra si procede con la standardizzazione degli inoculi. Partendo da una coltura overnight, la standardizzazione viene effettuata prelevando alcune colonie con un tampone sterile dalla piastra O/N e inoculandole in MHII brodo. Successivamente viene misurata la densità ottica allo spettrofotometro (OD_{625nm}) che viene aggiustata in modo da ottenere un valore di 0,1 che corrisponde ad una concentrazione di circa 1×10^8 UFC/ml. In seguito, viene eseguita una diluizione 1:100 della sospensione batterica che viene così inoculata (50 µL) in ciascun pozzetto delle righe della piastra microtiter (ogni riga corrisponde ad un determinato ceppo da testare). In questo modo ogni ceppo viene testato con concentrazioni scalari dell'antibiotico. L'inoculo finale presente in ogni pozzetto ha una concentrazione pari a 5×10^5 UFC/ml. Tra i ceppi testati viene sempre incluso il ceppo di riferimento

Enterococcus faecalis ATCC 29212. La piastra viene incubata a 37°C per 24 ore.

I valori di MIC ottenuti erano interpretati secondo i breakpoints stabiliti dal CLSI e riportati in *Tabella 5*

Antibiotico	MIC breakpoints		
	S	I	R
Linezolid	≤ 2	4	≥ 8
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4
Acido fusidico	-	-	-

Tabella 5. Breakpoints per gli antibiotici testati

4. RISULTATI

4.1 *Saggi di coniugazione in vivo*

I saggi di coniugazione *in vivo* descritti in questo lavoro di tesi sono stati eseguiti esponendo esemplari di mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* a due ceppi di *E. faecium*: LSEF2 utilizzato come ceppo donatore del plasmide che trasporta il gene *poxA* responsabile del fenotipo di resistenza al florfenicolo e 64/3 utilizzato come ceppo ricevente. Prima di eseguire i saggi, i mitili sono stati sottoposti ad una fase di depurazione necessaria per ridurre il più possibile la presenza di microrganismi contaminanti, e soprattutto escludere la presenza di enterococchi che potessero interferire con i successivi saggi di coniugazione.

4.1-1 *Saggi di coniugazione in vivo, condizione 1: inoculo dei ceppi in acqua*

Per prima cosa è stata calcolata la concentrazione iniziale dei ceppi donatore e ricevente a partire dalle letture dell'OD_{650nm} delle brodocolture O/N per calcolare i volumi e le concentrazioni batteriche da inoculare nei becher (Tabella 6).

BEACHER	CEPPO	OD_{650nm}
1	LSEF2	1
	64/3	0,9
2	LSEF2	1
	64/3	1

Tabella 6. Letture OD_{650 nm} delle brodoculture di LSEF2 e 64/3

Poiché sappiamo che un valore di OD_{650nm} di 0,1 corrisponde ad una concentrazione di cellule batteriche pari a circa 1×10^8 CFU/ml, tramite una proporzione, si ricava che una lettura dell'OD_{650nm} = 1 corrisponde all'incirca a 1×10^9 CFU/ml. In 200 ml di brodocultura di LSEF2 sarà quindi presente una concentrazione cellulare di circa 2×10^{11} CFU/ml (sia per l'inoculo del becher 1 che del 2). In 400 ml di brodocultura di 64/3 la concentrazione batterica sarà invece pari a circa 4×10^{11} CFU/ml. Dopo la centrifugazione delle brodoculture i pellet sono stati risospesi in 50 ml di acqua di mare sterile per cui si raggiungono le concentrazioni di 4×10^9 CFU/ml per il donatore e 8×10^9 CFU/ml per il ricevente. Poiché questo volume di 50 ml viene utilizzato per inoculare un becher contenente 5 L di acqua di mare sterile, la concentrazione dei due ceppi al loro interno sarà diluita 1:100.

Teoricamente quindi all'interno di ciascun becher dovrebbero essere presenti: 4×10^7 CFU/ml del ceppo LSEF2 e 8×10^7 CFU/ml del ceppo 64/3.

Per verificare l'effettivo numero di CFU/ml nei due becher, subito dopo l'inoculo (T_0) sono state prelevate delle aliquote che sono state piastrate. I risultati delle conte a T_0 sono riportati in *Tabella 7*.

	BECHER 1	BECHER 2
LSEF2 (CFU/ml)	$2,6 \times 10^7$	2×10^7
64/3 (CFU/ml)	$1,3 \times 10^8$	1×10^8

Tabella 7. Concentrazione dei batteri in acqua a T_0

Le concentrazioni batteriche a T_0 rispettavano quelle attese, con concentrazioni iniziali del ceppo donatore 10 volte superiori a quelle del ricevente in entrambi i becher.

Ripetendo la conta vitale dopo 1h (T_1) e 24h (T_2) dall'inoculo, si osservava che la concentrazione dei ceppi donatore e ricevente in acqua si manteneva pressoché costante fino a 24 ore dall'inoculo, dimostrando che i batteri erano in grado di sopravvivere in acqua nel periodo preso in considerazione per i successivi esperimenti di coniugazione (*Grafico 1*).

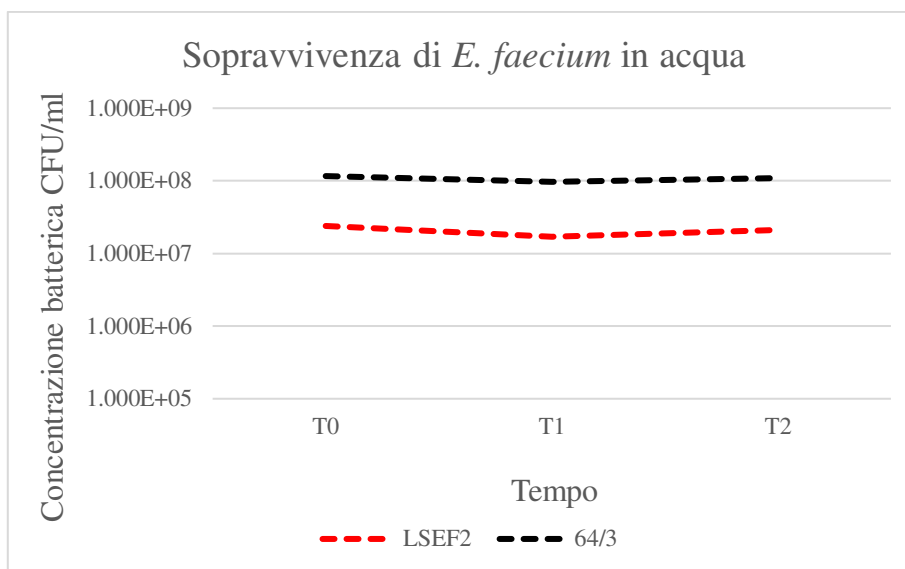


Grafico 1. Sopravvivenza dei ceppi E. faecium LSEF2 e 64/3 in acqua

➤ *Bioaccumulo*

La concentrazione batterica (CFU/g) dei due ceppi all'interno dei tessuti dei mitili è stata calcolata con la seguente formula:

$$\frac{[n \text{ colonie} \times \text{fattore di diluizione} \times \text{ml di omogenato risospeso}]}{\text{peso mollusco (g)}}$$

I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 8.

	T₁	T₂
LSEF2 (CFU/ml)	2,5x10 ⁷	3,5x 10 ⁶
64/3 (CFU/ml)	3,0x10 ⁶	3,9x10 ⁶

Tabella 8. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 nei mitili a T1 e T2

A T₁ (dopo 1 ora dall'inoculo dei batteri in acqua) abbiamo valutato la concentrazione dei due ceppi all'interno dei mitili in seguito all'attività di filtrazione. LSEF2 aveva una concentrazione simile a quella in acqua e superiore di circa 1 log rispetto a quella di 64/3. Il ceppo ricevente era invece presente nei mitili a concentrazioni 100 volte inferiori a quelle riscontrate in acqua. Tuttavia, dopo 24h (T₂) le concentrazioni dei due ceppi ritrovate nei mitili erano pressoché uguali (Tabella 8 e Grafico 2).

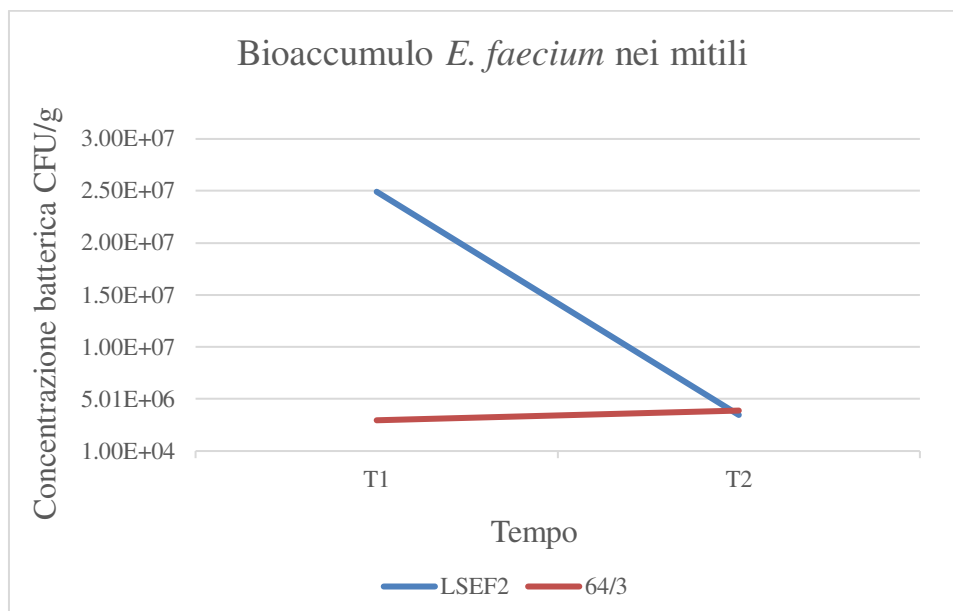


Grafico 2. Bioaccumulo dei ceppi *E. faecium* LSEF2 e 64/3 nei mitili

➤ **Efficienza di coniugazione**

Dopo aver constatato la sopravvivenza dei ceppi donatore e ricevente sia in acqua che all'interno dei mitili fino a 24 ore dopo l'inoculo, è stata valutata l'efficienza di coniugazione tramite la ricerca di ceppi transconiuganti in acqua

e nei mitili e successivamente è stata calcolata la frequenza di coniugazione. I risultati ottenuti sono riportati in *Tabella 9*.

MATRICE	T₁	F	T₂	F
ACQUA	-	-	1	9,17x10⁻⁹
MITILI	15	2,07x10⁻⁷	396	5,08x10⁻⁶

Tabella 9. Numero di colonie di transconiuganti e frequenza di coniugazione in acqua e mitili a T1 e T2.

La frequenza di coniugazione aumenta dopo 24 ore (T₂) sia nell'acqua (da 0 a 9x10⁻⁹) che nei mitili (da 2x10⁻⁷ a 5x10⁻⁶). Il tempo di contatto è quindi un aspetto cruciale per il processo di coniugazione e probabilmente un'esposizione di 1 ora non è sufficiente per la riuscita ottimale dell'esperimento. La frequenza di coniugazione era circa 3 logaritmi maggiore nei mitili rispetto a quella ottenuta in acqua.

4.1-2 Saggi di coniugazione in vivo, condizione 2: iniezione dei ceppi nel muscolo adduttore dei mitili

Per verificare la capacità dei ceppi di coniugare all'interno dei mitili ed escludere la possibilità che i transconiuganti trovati nei mitili fossero in realtà filtrati dall'acqua, abbiamo provato ad iniettare direttamente i ceppi nel

muscolo adduttore delle cozze. Le concentrazioni batteriche dell'inoculo sono state calcolate a partire dalle letture dell'OD_{650nm} riportate in *Tabella 10*.

BECHER	CEPPO	OD _{650nm}
3	LSEF2	0,96
	64/3	0,8
4	LSEF2	0,95
	64/3	0,87

Tabella 10. Letture OD_{650 nm} delle brodoculture di LSEF2 e 64/3

In base alla densità ottica le brodoculture overnight contenevano circa 9×10^8 CFU/ml. Quindi 5 ml ($4,5 \times 10^9$ CFU) di brodocultura dei due ceppi sono stati centrifugati e i pellet sono stati risospesi in 1 ml di PBS sterile ottenendo una concentrazione di $4,5 \times 10^9$ CFU/ml per ciascun ceppo. Le due sospensioni vengono mescolate cosicché in 2 ml totali, la concentrazione di ognuno dei due ceppi si dimezza ottenendo circa: $2,2 \times 10^9$ CFU/ml. 50 µL di questa sospensione, contenente i due ceppi è stata quindi utilizzata come inoculo da iniettare nel muscolo adduttore di 5 esemplari di mitili.

Le concentrazioni batteriche dei ceppi donatore e ricevente nelle varie matrici, immediatamente dopo l'iniezione nel muscolo adduttore, sono riportate in *Tabella 11*:

	ACQUA (CFU/ml)	EMOLINFA (CFU/ml)	MITILI (CFU/g)
LSEF2	$1,8 \times 10^3$	$3,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
64/3	$2,9 \times 10^3$	$3,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$

Tabella 11. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 al T₀ nelle varie matrici

La concentrazione batterica in emolinfa è di circa 4 logaritmi inferiore rispetto a quella teoricamente inoculata ($\sim 3 \times 10^5$ vs $2,2 \times 10^9$ CFU/ml).

La presenza di batteri nell'acqua denota inoltre il fatto che probabilmente i mitili eliminano all'esterno una parte dei batteri immediatamente dopo l'iniezione. Vi è una concentrazione batterica piuttosto elevata anche nell'intero corpo del mollusco ($\sim 2,6 \times 10^6$) suggerendo che parte dei batteri iniettati nell'emolinfa, attraverso l'apparato circolatorio, sono in grado di invadere subito i tessuti dell'animale.

La concentrazione batterica dei ceppi è stata poi monitorata dopo 1 ora e dopo 24 ore dall'inoculo. I risultati delle conte sono riportati in Tabella 12 e Grafico 3.

	T ₁		T ₂	
	LSEF2	64/3	LSEF2	64/3
ACQUA	8,77x10 ³	1,38x10 ⁴	8,37x10 ³	8,85x10 ³
EMOLINFA	8,60x10 ⁴	8,80x10 ⁴	5,18x10 ³	5,60x10 ³
MITILI	9,14x10 ⁴	1,29x10 ⁵	1,58x10 ⁵	1,66x10 ⁵

Tabella 12. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 a T1 e T2 nelle varie matrici

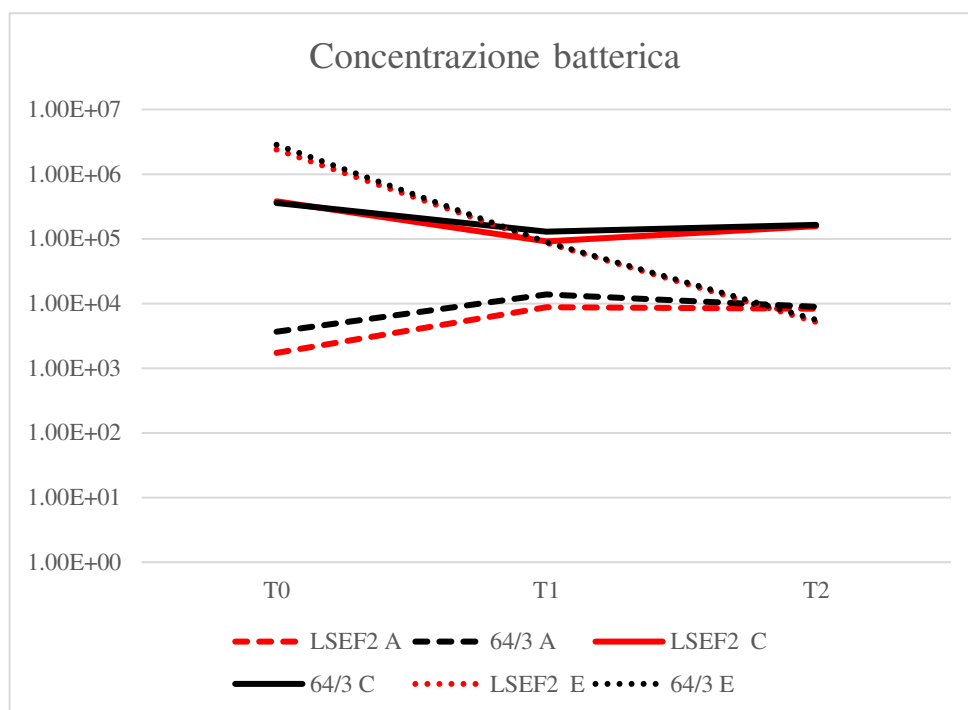


Grafico 3. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 da T0 a T2 in acqua (A), emolinfina (E) e mitili (C)

Dai risultati si evince che la concentrazione batterica dei due ceppi in acqua subisce un leggero aumento dopo 1 ora dall'inoculo, per poi rimanere stabile nelle 24 ore. Questo è probabilmente dovuto al fatto che i mitili espellono

nell'ambiente esterno una parte dei microrganismi iniettati. Anche nel caso dei mitili la concentrazione batterica rimane più o meno costante per tutta la durata dell'esperimento. Nell'emolinfa si nota una drastica e proporzionale diminuzione della concentrazione nel corso delle 24 ore e questo potrebbe essere dovuto all'attività del sistema immunitario dei mitili; all'interno dell'emolinfa dei mitili sono infatti presenti cellule con attività fagocitaria e molecole con attività battericida (es. lisozima) (Antunes et al., 2014).

➤ ***Efficienza di coniugazione***

Dopo aver valutato le concentrazioni batteriche dei due ceppi donatore e ricevente nelle varie matrici e nei tempi testati, è stata valutata l'efficienza di coniugazione attraverso la ricerca dei transconiuganti in acqua, emolinfa e mitili. In nessun caso sono stati osservati transconiuganti, probabilmente a causa delle concentrazioni dei ceppi donatore e ricevente troppo basse (vedi Tabella 11 e 12).

L'esperimento è stato quindi ripetuto, aumentando le concentrazioni batteriche iniziali dei due ceppi. Le conte a T_0 hanno dato i seguenti risultati (Tabella 13):

	ACQUA	EMOLINFA	MITILI
LSEF2	$1,3 \times 10^5$	$7,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
64/3	5×10^5	1×10^8	$2,9 \times 10^7$

Tabella 13. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 a T₀ nelle varie matrici

Le concentrazioni batteriche nelle varie matrici, dopo 1 e 24 ore sono riportate in *Tabella 14* e *Grafico 4*:

	T₁		T₂	
	LSEF2	64/3	LSEF2	64/3
ACQUA	$1,98 \times 10^5$	$4,92 \times 10^5$	$2,12 \times 10^5$	$1,50 \times 10^6$
EMOLINFA	$1,88 \times 10^6$	$4,13 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$3,93 \times 10^6$
MITILI	$5,44 \times 10^6$	$1,17 \times 10^7$	$6,70 \times 10^6$	$1,29 \times 10^7$

Tabella 14. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 al T₁ e T₂ nelle varie matrici

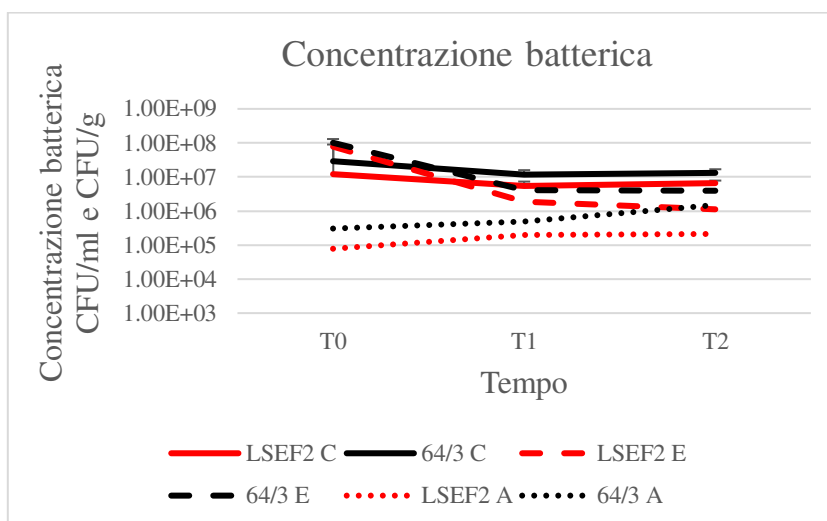


Grafico 4. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 da T₀ a T₂ in acqua (A), emolinfa (E) e mitili (C)

Anche in questo caso, già a T_0 sono presenti batteri in acqua ($\sim 10^5$) che vanno ad aumentare di circa 1 log nel corso delle 24 ore. Nei mitili a T_0 è presente una concentrazione piuttosto elevata di batteri ($\sim 2 \times 10^7$) e circa un log inferiore rispetto all'emolinfa. Nelle 24 h la concentrazione rimane piuttosto stabile. Nell'emolinfa si osserva, invece, un calo drastico della concentrazione batterica di circa 2 log già dopo 1 ora dall'inoculo batterico per poi rimanere pressoché stabile nel corso delle 24 ore.

➤ ***Efficienza di coniugazione***

La ricerca dei transconiuganti nelle varie matrici ha fornito i seguenti risultati (*Tabella 15*):

MATRICE	T₁	F	T₂	F
ACQUA	-	-	-	-
EMOLINFA	5	8X10⁻⁷	-	-
MITILI	33	2,8X10⁻⁷	36	8,1X10⁻⁷

Tabella 15. Numero di colonie di transconiuganti e frequenza di coniugazione in acqua, emolinfa e mitili a T1 e T2

Come si denota dai risultati in tabella, all'interno dell'acqua non avviene coniugazione. Nei mitili la frequenza di coniugazione aumenta da T_1 a T_2 passando da $2,8 \times 10^{-7}$ a $8,1 \times 10^{-7}$ mentre nell'emolinfa la coniugazione avviene

solo a T_1 con una frequenza di coniugazione identica a quella osservata nei mitili: 8×10^{-7} .

Confrontando i risultati dei due esperimenti di coniugazione *in vivo* eseguiti iniettando i ceppi all'interno del muscolo adduttore si evince che:

- Aumentando di circa 2 log l'inoculo di partenza si ottiene effettivamente un aumento della concentrazione batterica di circa 2 log nell'emolinfa raggiungendo una concentrazione di $\sim 10^8$. Analogamente le concentrazioni aumentano anche nell'acqua (di 2 log) e nei mitili (1 log).
- Aumentando la concentrazione batterica all'interno dell'emolinfa, la coniugazione avviene con una frequenza di 8×10^{-7} . Probabilmente affinché si verifichi la coniugazione è necessaria una concentrazione batterica più elevata dei ceppi donatore e ricevente in emolinfa rispetto al primo esperimento anche perché in emolinfa l'attività battericida tende a ridurre il numero di batteri di 2 log nell'arco di 24 ore.
- Aumentando la quantità di batteri iniettati, aumenta anche la concentrazione batterica nei tessuti dei mitili.
- Nell'acqua non avviene coniugazione dimostrando che lo scambio di materiale genetico avviene effettivamente all'interno dei mitili.

4.1-3 Confronto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di coniugazione in vivo: inoculo dei ceppi in acqua vs iniezione nel muscolo adduttore

		Batteri in acqua		Batteri nel muscolo		Batteri nel muscolo	
				1		2	
		T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂
Acqua	LSEF2	1,70E+07	2,10E+07	8,77E+03	8,37E+03	1,98E+05	2,12E+05
	64/3	9,68E+07	1,09E+08	1,38E+04	8,85E+03	4,92E+05	1,50E+06
	F	-	9,17x10⁻⁹	-	-	-	-
Mitili	LSEF2	2,49E+07	3,48E+06	9,14E+04	1,58E+05	5,44E+06	6,70E+06
	64/3	2,97E+06	3,90E+06	1,29E+05	1,66E+05	1,17E+07	1,29E+07
	F	2,07-10⁻⁷	5,08x10⁻⁶	-	-	2,8x10⁻⁷	8,1x10⁻⁷
Emolinfia	LSEF2			8,60E+04	5,18E+03	1,88E+06	1,12E+06
	64/3			8,80E+04	5,60E+03	4,13E+06	3,93E+06
	F			-	-	8x10⁻⁷	-

Tabella 16. Confronto tra le concentrazioni batteriche (CFU/ml) e le frequenze di coniugazione dei tre esperimenti di coniugazione in vivo

4.2 Saggi di coniugazione in vitro in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

Sono stati effettuati esperimenti di coniugazione *in vitro* in presenza di diverse concentrazioni di florfenicolo per verificare se determinate concentrazioni di antibiotico erano in grado di stimolare il trasferimento del plasmide dal ceppo donatore al ricevente. Le concentrazioni testate erano comprese nel range 0.12-50 µg/ml.

Per prima cosa è stato valutato se le diverse concentrazioni di antibiotico influissero sulla crescita e sopravvivenza dei due ceppi batterici.

Per quanto riguarda il ceppo donatore *E. faecium* LSEF2, seppur con qualche piccola oscillazione, la crescita batterica sembrava essere stimolata dalle varie concentrazioni di florfenicolo testate, aumentando di circa un logaritmo.

Per il ceppo ricevente *E. faecium* 64/3, le varie concentrazioni di antibiotico sembravano ridurre di circa un logaritmo la crescita batterica, senza comunque ucciderlo (*Grafico 5*).

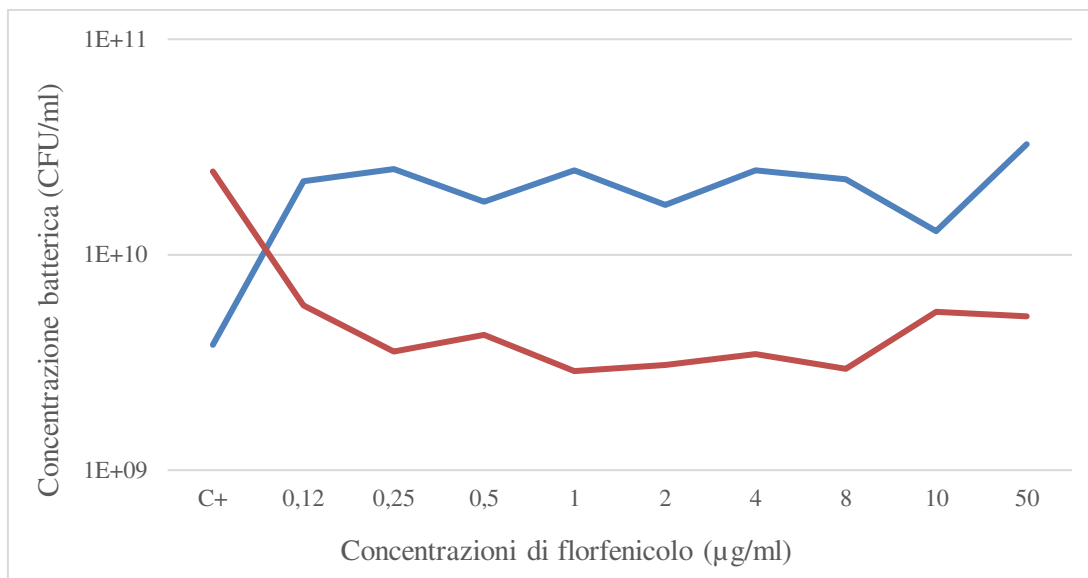


Grafico 5. Andamento della concentrazione batterica di *E. faecium* LSEF2 e 64/3 in presenza di concentrazioni crescenti di florfenicolo

Le frequenze di coniugazione, ottenute da esperimenti di coniugazione su filtro in presenza di concentrazioni crescenti di antibiotico, aumentavano in maniera inversamente proporzionale all'aumento della concentrazione di florfenicolo testato (*Grafico 6*), suggerendo che concentrazioni sub-MIC di antibiotico sono in grado di stimolare il passaggio del plasmide contenente il gene *poxA* *in vitro*.

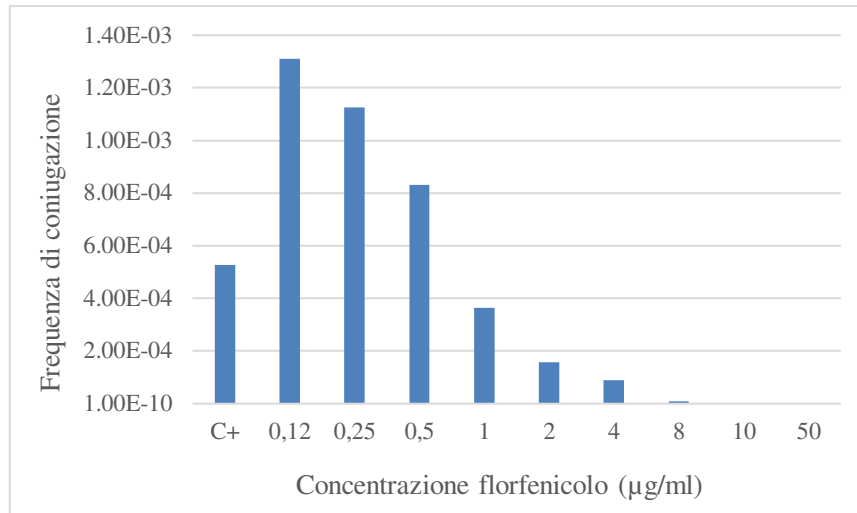


Grafico 6. *Influenza delle diverse concentrazioni di florfenicolo sulle frequenze di coniugazione*

4.3 Saggi di coniugazione in vivo in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

In base ai risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo voluto verificare se concentrazioni sub-inibenti di antibiotico aggiunte nell'acqua di stabulazione delle cozze erano in grado di influire il passaggio di materiale genetico tra batteri anche *in vivo*. Per gli esperimenti *in vivo* sono state scelte le concentrazioni 0.12 e 1 µg/ml di florfenicolo.

I ceppi donatore e ricevente sono stati fatti crescere O/N in assenza (controllo positivo) e in presenza delle concentrazioni di antibiotico scelte. Il giorno seguente è stata calcolata la concentrazione batterica partendo dalle letture dell'OD_{650nm} delle brodoculture O/N (*Tabella 17*) e i risultati verificati con le conte vitali a T₀.

CONDIZIONE	LSEF2 (OD_{650nm})	64/3 (OD_{650nm})
FFC 0 µ/ml	1.24	1.18
FFC 0,12 µg/ml	1.23	0.97
FFC 1 µg/ml	1.22	1.2

Tabella 17. Letture dell'OD delle brodoculture di LSEF2 e 64/3.

Eseguendo i vari calcoli (descritti nei paragrafi precedenti) si ricava la concentrazione batterica (attesa) inoculata all'interno dei becher. (*Tabella 18*):

CONDIZIONE	LSEF2 (UFC/ml)	64/3 (UFC/ml)
FFC 0 µ/ml	4,9x10 ⁷	9,4x10 ⁷
FFC 0,12 µg/ml	4,92x10 ⁷	7,6x10 ⁷
FFC 1 µg/ml	4,8x10 ⁷	9,6x10 ⁷

Tabella 18. Concentrazione batterica iniziale attesa di LSEF2 e 64/3 nelle tre condizioni testate

La concentrazione dei ceppi donatore e ricevente in acqua a T₀ (immediatamente dopo l'inoculo) ricavata dalle conte è riportata in *Tabella 19*.

	FFC 0 µ/ml	FFC 0,12 µg/ml	FFC 1 µg/ml
LSEF2(CFU/ml)	5,3X10 ⁷	4X10 ⁷	2,7X10 ⁷
64/3 (CFU/ml)	1,54X10 ⁸	1X10 ⁸	1,35X10 ⁸

Tabella 19. Concentrazione batterica di LSEF2 e 64/3 in acqua a T₀

Poiché le conte a T_0 rispecchiano i valori attesi, si può concludere che gli inoculi sono stati preparati correttamente. Poiché i precedenti esperimenti di coniugazione avevano mostrato che le frequenze di coniugazione più elevate si verificavano dopo 24 h, in questo caso la presenza di transconiuganti è stata valutata solo dopo 24 h dall'inoculo batterico.

Dopo 24 ore, è stato osservato che per entrambi i ceppi, non si nota una riduzione significativa della concentrazione in acqua rispetto a quella iniziale, l'ordine di grandezza resta 10^7 e 10^8 rispettivamente per donatore e ricevente; per cui concentrazioni sub-MIC di antibiotico sembrano non influenzare la sopravvivenza dei ceppi donatore e ricevente (*Tabella 20*).

	FFC 0 $\mu\text{g/ml}$	FFC 0,12$\mu\text{g/ml}$	FFC 1$\mu\text{g/ml}$
LSEF2(CFU/ml)	$4,30 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$	$4,12 \times 10^7$
64/3 (CFU/ml)	$1,09 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$	$1,51 \times 10^8$

Tabella 20. Concentrazione batteria di LSEF2 e 64/3 a T1 nelle tre condizioni testate

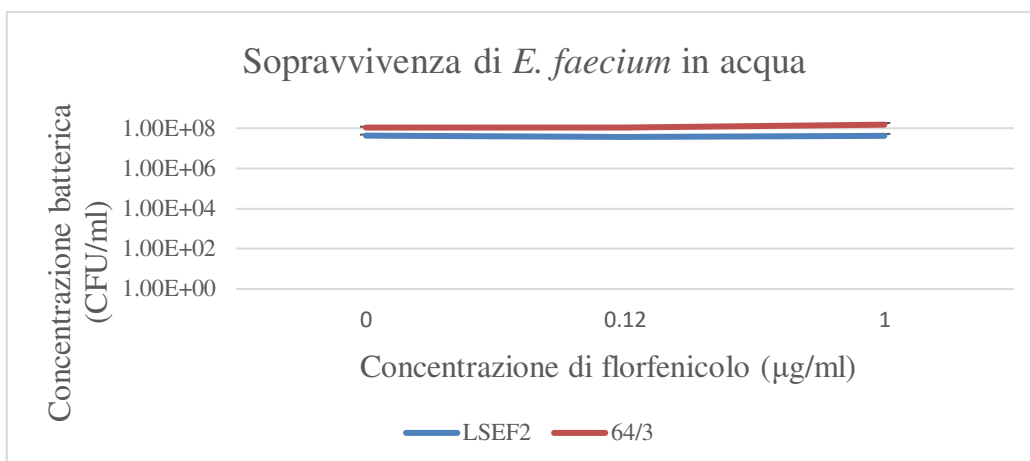


Grafico 7. Sopravvivenza di *E. faecium* LSEF2 e 64/3 in acqua nelle tre condizioni testate

La concentrazione batterica dopo 24 ore è pressoché la stessa nelle tre condizioni testate (Grafico 7).

➤ **Bioaccumulo**

Dopo 24 ore dall'inoculo batterico e di esposizione a tre concentrazioni diverse di florfenicolo, è stato valutato il bioaccumulo dei ceppi donatore e ricevente nelle tre condizioni testate, ottenendo i risultati riportati in Tabella 21.

	FFC 0 µg/ml	FFC 0,12 µg/ml	FFC 1 µg/ml
LSEF2(CFU/ml)	1,74x10 ⁸	5,02x10 ⁶	1,13x10 ⁷
64/3 (CFU/ml)	9,23x10 ⁶	1,59x10 ⁶	3,3x10 ⁷

Tabella 21. Concentrazioni batteriche di LSEF2 e 64/3 nei mitili dopo 24h dall'inoculo batterico in presenza di tre concentrazioni diverse di florfenicolo

Nel *Grafico 8* viene confrontato il bioaccumulo nelle tre condizioni.

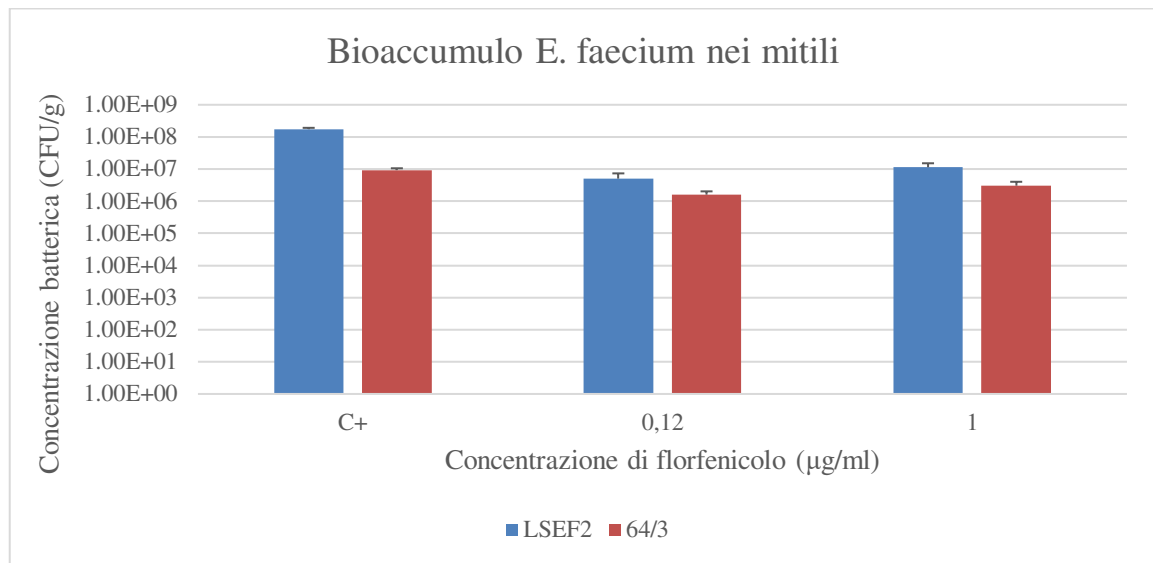


Grafico 8. Confronto del bioaccumulo nelle tre condizioni

➤ *Efficienza di coniugazione*

L'efficienza di coniugazione viene valutata attraverso la ricerca dei transconiuganti sia nell'acqua che nei mitili per ciascuna condizione testata.

Successivamente viene calcolata la frequenza di coniugazione. I risultati sono riportati in *Tabella 22*:

MATRICE	CONDIZIONE	TC (CFU/ml)	F
ACQUA	FFC 0 µg/ml	2	1,84x10⁻⁸
	FFC 0,12 µg/ml	7	5,49x10⁻⁸
	FFC 1 µg/ml	3	1,98x10⁻⁸
MITILI	FFC 0 µg/ml	3	2,96x10⁻⁸
	FFC 0,12 µg/ml	-	-
	FFC 1 µg/ml	1	1,14x10⁻⁸

Tabella 22. Frequenza di coniugazione in acqua e mitili nelle tre condizioni

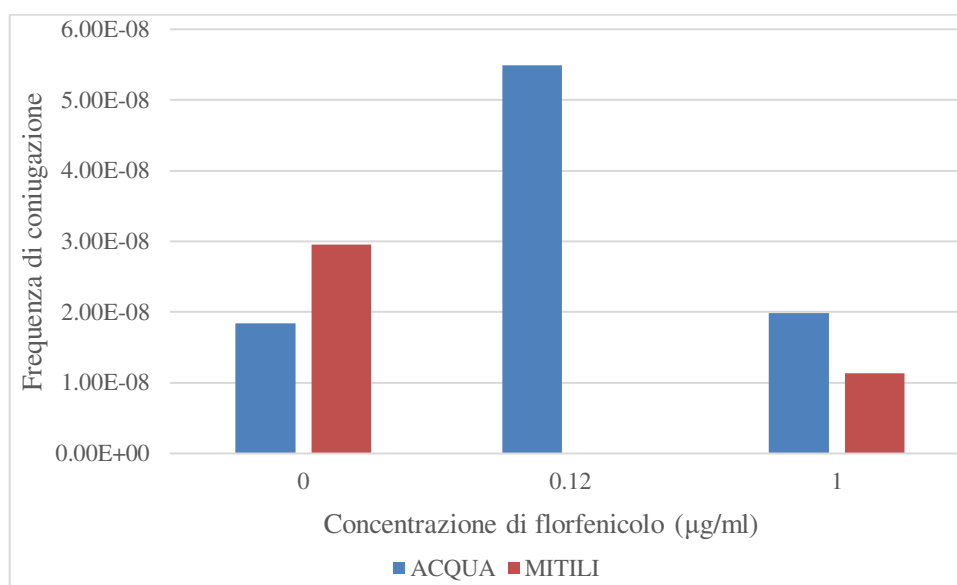


Grafico 9. Confronto delle frequenze di coniugazione ottenute nelle tre condizioni testate

Le frequenze di coniugazione ottenute nelle tre condizioni (*Grafico 9*) sono molto simili, sia nell'acqua che nei mitili indicando che le concentrazioni sub-MIC di antibiotico testate non influiscono il trasferimento di materiale

genetico. Trattandosi di un esperimento pilota, questi sono solamente risultati preliminari e sarebbe opportuno ripetere l'esperimento più volte, cambiando anche le concentrazioni di antibiotico testate, per confermare i risultati.

4.4 Saggi di coniugazione in vitro in emolinfa in presenza di concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico

Inizialmente sono state calcolate le concentrazioni batteriche teoriche dei ceppi donatore e ricevente inoculati, basandosi sulle letture dell'OD_{650nm} che sono risultate essere per entrambi 1,11. Eseguendo i calcoli (descritti nei paragrafi precedenti), la concentrazione batterica teorica è di circa $1,6 \times 10^9$ CFU/ml. I due ceppi così standardizzati sono stati quindi risospesi in emolinfa, mescolati (1:1) e aggiunti ai pozzetti di una microtiter in assenza o in presenza di florfenicolo (0,12 µg/ml o 1 µg/ml). Subito dopo l'inoculo sono state eseguite le conte a T₀, nelle tre condizioni testate, che hanno dato i seguenti risultati (*Tabella 23*):

CONDIZIONE	LSEF2 (CFU/ml)	64/3 (CFU/ml)
FFC 0 µg/ml	1,01x10 ⁹	1,45x10 ⁹
FFC 0,12 µg/ml	1,02x10 ⁹	9,99x10 ⁸
FFC 1 µg/ml	9,88x10 ⁸	2,32x10 ⁹

Tabella 23. Concentrazione batterica dei ceppi LSEF2 e 64/3 a T₀

Le conte batteriche dei due ceppi sono state ripetute dopo 30 min (T1), 1h (T2), 2h (T3), 4h (T4) e 24 h (T5) di incubazione. Le concentrazioni batteriche dei due ceppi ai diversi tempi di esposizione testati nelle tre condizioni sono riportate in *Tabella 24*, *Tabella 25* e *Tabella 26*:

TEMPO	LSEF2 (CFU/ml)	64/3 (CFU/ml)
T1	9,01x10 ⁸	9,22x10 ⁸
T2	1,08x10 ⁹	7,32x10 ⁸
T3	8,40x10 ⁸	6,70x10 ⁸
T4	8,10x10 ⁸	3,02x10 ⁸
T5	1,04x10 ⁹	7,0x10 ⁸

Tabella 24. Concentrazione batterica LSEF2 e 64/3 ai vari tempi testati in assenza di antibiotico

TEMPO	LSEF2 (CFU/ml)	64/3 (CFU/ml)
T1	9,16x10 ⁸	9,22x10 ⁸
T2	9,48x10 ⁸	7,83x10 ⁸
T3	8,18x10 ⁸	6,65x10 ⁸
T4	6,53x10 ⁸	3,45x10 ⁸
T5	9,20x10 ⁸	6,98x10 ⁸

Tabella 25. Concentrazione batterica LSEF2 e 64/3 ai vari tempi testati con FFC 0,12 µg/ml

TEMPO	LSEF2 (CFU/ml)	64/3 (CFU/ml)
T1	1,04x10 ⁹	1,06x10 ⁹
T2	8,63x10 ⁸	7,02x10 ⁸
T3	8,23x10 ⁸	6,70x10 ⁸
T4	8,88x10 ⁸	2,92x10 ⁸
T5	9,13x10 ⁸	7,68x10 ⁸

Tabella 26. Concentrazione batterica LSEF2 e 64/3 ai vari tempi testati con FFC 1 µg/ml

La concentrazione batterica dei due ceppi donatore e ricevente si mantiene costante da T₀ a T₅ ossia dall'inizio fino a 24 ore di esposizione in tutte le condizioni testate, come si denota anche dal Grafico 10 e Grafico 11.

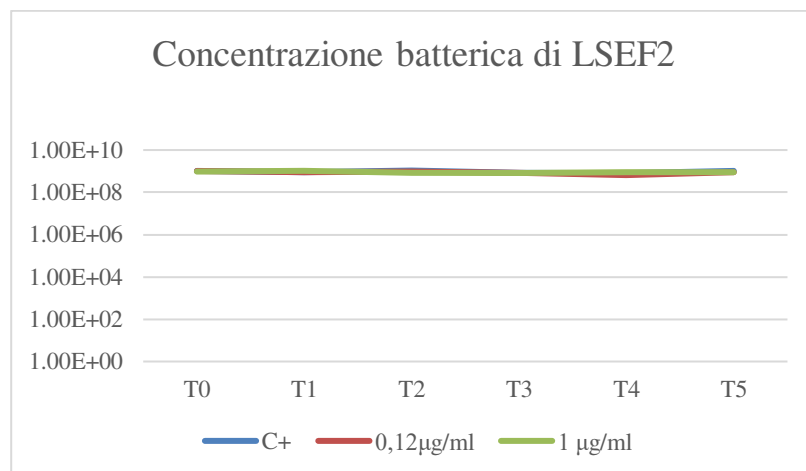


Grafico 10. Concentrazione batterica di LSEF2 nei tempi testati

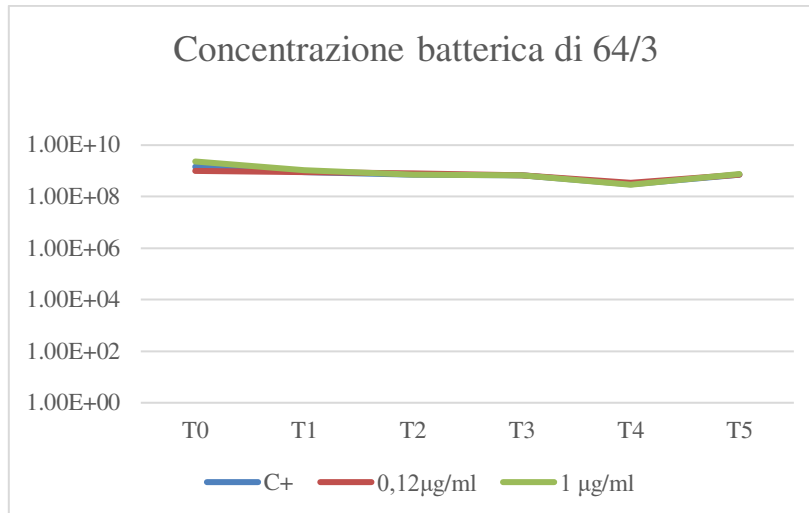


Grafico 11. Concentrazione batterica di 64/3 nei tempi testati

➤ ***Efficienza di coniugazione***

Dopo aver dimostrato la sopravvivenza dei ceppi in emolinfa nei tempi dell'esperimento e in ogni condizione testata, sono stati ricercati i transconiuganti per valutare l'efficienza di coniugazione ed è stata calcolata la frequenza di coniugazione (*Tabella 27, Grafico 12*).

	T1	T2	T3	T4	T5
C+	$9,11 \times 10^{-7}$	$3,55 \times 10^{-7}$	$2,46 \times 10^{-7}$	$5,88 \times 10^{-7}$	$3,21 \times 10^{-8}$
0,12µg/ml	$8,51 \times 10^{-7}$	$3,35 \times 10^{-7}$	$3,68 \times 10^{-7}$	$4,20 \times 10^{-7}$	$6,44 \times 10^{-8}$
1 µg/ml	$3,85 \times 10^{-7}$	$4,10 \times 10^{-7}$	$3,43 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$	$6,83 \times 10^{-8}$

Tabella 27. Frequenze di coniugazione nei tempi e condizioni testate

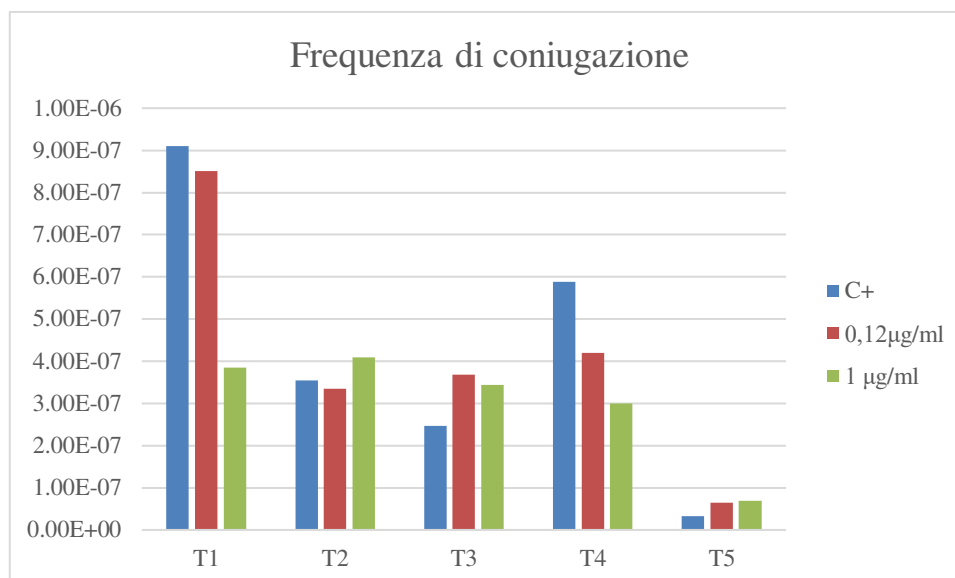


Grafico 12. Frequenze di coniugazione nei tempi e condizioni testate

In tutte le condizioni le frequenze di coniugazione più elevate si ottengono a T1, cioè dopo 30 minuti. Col passare del tempo le frequenze di coniugazione si abbassano raggiungendo i valori più bassi dopo 24 ore, sia in presenza che in assenza di antibiotico.

4.4-1 Caratterizzazione genotipica dei ceppi transconiuganti

Alcuni dei ceppi transconiuganti ottenuti negli esperimenti di coniugazione sono stati sottoposti all'analisi genotipica mediante saggi di PCR e PFGE.

I saggi di PCR sono stati svolti con lo scopo di valutare la presenza del gene *poxA* nei ceppi transconiuganti. Sono stati selezionati per l'analisi due ceppi per ogni tempo e condizione testati.

Tutti i presunti ceppi transconiuganti sono risultati positivi per il gene *poxA*, si è ipotizzato quindi un possibile trasferimento del plasmide dal ceppo donatore al ricevente (*Figura 16*).

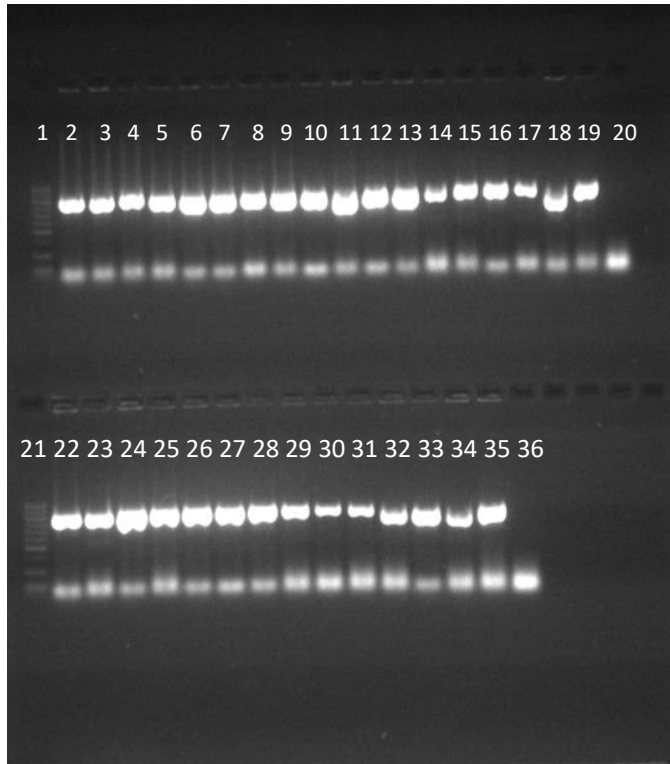


Figura 16. PCR poxA

1. Marker 100 bp
2. TC LSEF2
- 3-4. TC (C+ T1)
- 5-6. TC (FFC 0,12 T1)
- 7-8. TC (FFC 1 T1)
- 9-10. TC (C+ T2)
- 11-12. TC (FFC 0,12 T2)
- 13-14. TC (FFC 1 T2)
- 15-16. TC (C+ T3)
- 17-18. TC (FFC 0,12 T3)
- 19-23. TC (FFC 1 T3)
20. Controllo negativo
21. Marker 100 bp
22. LSEF2
- 24-25. TC (C+ T4)
- 26-27. TC (FFC 0,12 T4)
- 28-29. TC (FFC 1 T4)
- 30-31. TC (C+ T5)
- 32-33. TC (FFC 0,12 T5)
- 34-35. TC (FFC 1 T5)

Per l'analisi genotipica con PFGE, tra i ceppi sottoposti a PCR, è stato selezionato un transconiugante per ogni tempo e condizione testati. Questi isolati sono stati tipizzati mediante SmaI- PFGE e S1-PFGE.

L'analisi SmaI-PFGE ha evidenziato che i ceppi transconiuganti mostravano un profilo di restrizione differente da quello del ceppo donatore *E. faecium* LSEF2 e simile a quello del ceppo ricevente *E. faecium* 64/3 (Figura 17), confermando l'identità dei transconiuganti.



1. Low-Range PFG Marker
2. LSEF2
3. 64/3
4. TC (C+; T₂)
5. TC (FFC 0,12; T₂)
6. TC (FFC1; T₂)
7. TC (C+; T₃)
8. TC (FFC 0,12; T₃)
9. TC (FFC 1; T₃)
10. TC (C+; T₄)
11. TC (FFC 0,12; T₄)
12. TC (FFC 1; T₄)
13. TC (C+; T₅)
14. TC (FFC 0,12; T₅)
15. TC (FFC 1; T₅)

Figura 17. SmaI-PFGE

Gli stessi ceppi sono stati sottoposti a S1-PFGE per evidenziare la presenza del plasmide nei ceppi transconiuganti.

L'analisi ha messo in evidenza che all'interno dei ceppi transconiuganti è presente un plasmide di circa 140 kb come nel ceppo donatore *E. faecium* LSEF2 (*Figura 18*).

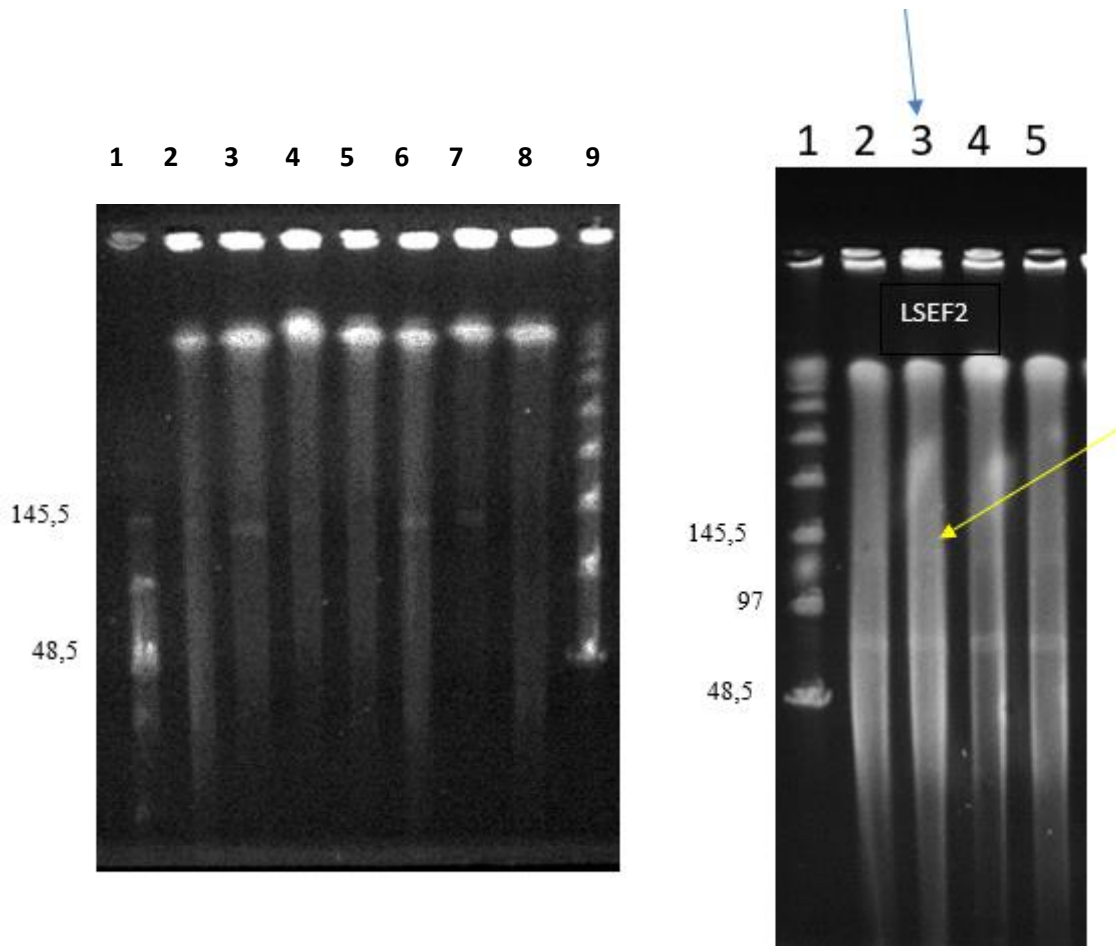


Figura 18. SI-PFGE

1. Low-Range PFG Marker
2. 64/3
3. LSEF2
4. TC (C+; T₂)
5. TC (FFC 0,12; T₂)
6. TC (FFC1; T₂)
7. TC (FFC 0,12; T₃)
8. TC (FFC 1; T₃)
9. Marker Lambda

4.4-2 Caratterizzazione fenotipica dei ceppi transconiuganti

È stato selezionato un transconiugante per ogni condizione e tempo testati e sono stati analizzati per confermare il fenotipo di resistenza al florfenicolo (lo stesso del ceppo donatore LSEF2) e all'acido fusidico e rifampicina (come il ceppo ricevente 64/3). La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata tramite determinazione della MIC con il metodo delle microdiluizioni in brodo, i cui risultati sono riportati in Tabella 28.

I presunti transconiuganti mostravano un fenotipo di resistenza al florfenicolo con valori di MIC compresi tra 64 e 128 µg/ml e alla rifampicina e all'acido fusidico con valori di MIC compresi tra 64 e >128 e 256/>256 rispettivamente confermando il passaggio della resistenza dal ceppo donatore al ricevente.

MIC transconiuganti (µg/ml)			
TC	FLORFENICOLO	RIFAMPICINA	ACIDO FUSIDICO
1	64	64	>256
2	128	64	>256
3	128	256	>256
4	128	128	>256
5	128	256	>256
6	128	64	>256
7	128	64	256
8	128	256	>256
9	64	256	256
10	64	256	>256
11	64	>256	>256
12	64	256	>256
13	64	>256	>256
14	64	256	>256
15	64	256	>256
LSEF2	128	4	4
64/3	1	128	>256

Tabella 28. MIC transconiuganti

5. DISCUSSIONE

L'utilizzo massivo degli antibiotici in diversi settori ha esposto i microrganismi a pressioni selettive senza precedenti, soprattutto i membri del microbiota umano e animale, promuovendo la mobilizzazione e il trasferimento genetico orizzontale (HGT) di un'ampia gamma di geni di resistenza agli antibiotici a molte specie batteriche, in particolare a quelle patogene. Le conseguenze ultime e ben note di tali eventi evolutivi stanno gradualmente aumentando le difficoltà nel prevenire e curare le infezioni batteriche (Larsson & Flach, 2022).

L'ecosistema marino nello specifico rappresenta un hot-spot potenzialmente significativo per l'emergenza, il mantenimento e la dispersione di microrganismi portatori di geni di antibiotico resistenza clinicamente rilevanti (S. R. & G., 2023). È stato stimato che gli ambienti marini contengono circa il 28% di ARGs la cui principale fonte deriva dal deflusso costiero di batteri antibiotico resistenti dall'ambiente terrestre. Inoltre, il rilascio diretto di residui di antibiotici nei sistemi marini derivante dalle attività antropiche contribuisce fortemente alla diffusione dell'antibiotico resistenza (Singh et al., 2022).

Conseguentemente all'attività di filtrazione, i molluschi bivalvi tra cui i mitili, possono concentrare all'interno dei propri tessuti sia residui di antibiotici che una vasta gamma di microrganismi opportunisti e/o patogeni alloctoni o

appartenenti alle comunità microbiche dell'ambiente acquatico rappresentando un rischio per la salute umana (Antunes et al., 2014). Inoltre, possono rappresentare un reservoir di geni di antibiotico-resistenza (Barros et al., 2011).

Partendo da questo background, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare se i molluschi bivalvi possano effettivamente rappresentare un habitat favorevole per i processi di trasferimento genetico orizzontale (HGT) di geni di antibiotico-resistenza e valutare l'influenza della presenza di concentrazioni di antibiotico esercita sulla trasmissibilità di tali geni. Inoltre, constatata la capacità di molti microrganismi di sopravvivere all'attività battericida esercitata dall'emolinfa dei mitili, un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare l'influenza dei meccanismi di difesa dell'animale sui fenomeni di trasferimento genetico, utilizzando l'emolinfa come mezzo di incubazione per esperimenti di coniugazione *in vitro*.

Pertanto, sono stati allestiti numerosi esperimenti di coniugazione utilizzando mitili della specie *M. galloprovincialis* come modello animale per testare *in vivo* la trasmissibilità di geni di antibiotico-resistenza tra ceppi del genere *Enterococcus spp.*

Il ceppo di *Enterococcus faecium* LSEF2, utilizzato come donatore, è stato isolato da campioni di sedimento marino provenienti dall'area costiera di

Ancona. Tale ceppo possiede la capacità di trasferire *in vitro* (con una frequenza di $6,5 \times 10^{-1}$) la resistenza agli oxazolidinoni conferita dal gene *poxA* presente in più copie su diversi plasmidi tra cui un plasmide di circa 27bp) (Fioriti et al., 2021) e uno di 140 bp (dati non pubblicati).

Gli oxazolidinoni sono antibiotici di ultima risorsa utilizzati nel trattamento di infezioni provocate da cocchi Gram positivi resistenti ad altri antibiotici; pertanto, la diffusione di fenomeni di resistenza a tali farmaci pone un serio problema di salute pubblica.

Il ceppo di *Enterococcus faecalis* 64/3 è stato utilizzato invece come ricevente. Si tratta di un ceppo ottenuto in laboratorio (sensibile al florfenicolo) reso resistente all'acido fusidico e alla rifampicina in seguito a consecutivi passaggi su terreno selettivo contenente i suddetti antibiotici.

Prima di procedere con gli esperimenti di coniugazione *in vivo*, gli esemplari di *M. galloprovincialis* sono stati sottoposti ad una fase di depurazione per due settimane in acqua di mare sterile, per consentire l'eliminazione di eventuali specie batteriche potenzialmente interferenti con i successivi saggi di coniugazione, soprattutto appartenenti al genere *Enterococcus*. Per confermare l'assenza di tali microrganismi, un esemplare è stato sacrificato ogni settimana.

I primi esperimenti di coniugazione *in vivo* sono stati eseguiti inoculando i ceppi donatore e ricevente nell'acqua in cui sono stati stabulati i mitili. Inizialmente è stata valutata la capacità dei ceppi di sopravvivere e rimanere vitali in acqua nei tempi dell'esperimento e poi il bioaccumulo da parte dei mitili, ossia la capacità di concentrare batteri vitali nei propri tessuti. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza l'andamento della concentrazione batterica nel tempo e hanno confermato una sopravvivenza completa nel corso delle 24 ore sia in acqua che nei tessuti dei mitili. Per quanto riguarda la frequenza di coniugazione, è stato osservato un aumento nel tempo sia in acqua (con valori molto bassi) che nei mitili; in particolare dopo 24 ore dall'inoculo dei batteri nel sistema, si osservava una frequenza di coniugazione molto più alta nei mitili ($5,08 \times 10^{-6}$) che nell'acqua ($9,17 \times 10^{-9}$) mentre dopo 1 ora dall'inoculo solo nei mitili avveniva coniugazione con una frequenza di $2,07 \times 10^{-7}$. Questo dimostra innanzitutto che il processo di coniugazione avviene più facilmente nei mitili che in acqua nonostante la concentrazione batterica fosse leggermente più bassa, probabilmente perché è maggiore la possibilità e la durata del contatto tra le cellule batteriche.

A questo punto visto che la coniugazione sembrava avvenire sia in acqua che internamente ai molluschi, per escludere l'ipotesi che i transconiuganti trovati nei molluschi fossero in realtà filtrati dai mitili direttamente dall'acqua,

abbiamo provato ad inoculare i ceppi direttamente nel muscolo adduttore degli animali. Questi esperimenti ci hanno consentito anche di valutare l'influenza del sistema immunitario degli animali sul processo di coniugazione e sulla sua frequenza. Da questi esperimenti è emerso che i batteri, nonostante fossero inoculati direttamente nell'emolinfa dei molluschi, venivano isolati anche in acqua e nel resto del corpo dell'animale per cui abbiamo ipotizzato un probabile e immediato rilascio dei microrganismi in acqua da parte dei molluschi. Tuttavia, solo nell'emolinfa si notava una netta e proporzionale diminuzione della sopravvivenza batterica (da $\sim 4 \times 10^5$ a $\sim 5 \times 10^3$ CFU/ml) dimostrando effettivamente una potenziale attività battericida dell'emolinfa. In queste condizioni non è stata osservata coniugazione in nessuna delle matrici analizzate quindi lo stesso esperimento è stato ripetuto aumentando le concentrazioni di partenza degli inoculi ($\sim 1 \times 10^9$ CFU/ml). In questo caso abbiamo ottenuto transconiuganti sia dall'emolinfa che dal resto del corpo del mollusco, e non dall'acqua. La coniugazione avviene all'interno dell'emolinfa con una frequenza di 8×10^{-7} dopo un'ora di esposizione; dopo 24 ore di esposizione al contrario la frequenza probabilmente è così bassa da non essere rilevabile. Nei mitili, la coniugazione si verifica con frequenze molto simili a quelle in emolinfa ma inferiori rispetto a quelle che avevamo riscontrato inoculando i ceppi nell'acqua piuttosto che direttamente nei molluschi. Anche

in questo caso si potrebbe ipotizzare un'interferenza della risposta immunitaria degli animali sulla vitalità dei batteri. Inoltre, poiché non sono stati trovati transconiuganti in acqua, questo esperimento dimostrava che la coniugazione era avvenuta effettivamente nel mollusco e non nell'ambiente esterno, ovvero in acqua.

In conclusione, il verificarsi del processo di coniugazione nei tessuti dei mitili dipende innanzitutto dalla concentrazione batterica a cui gli esemplari sono esposti (in questo lavoro si presuppone debba essere almeno nell'ordine di 1×10^8), dal tempo di contatto (sicuramente superiore a 1 ora) e dalla capacità dei mitili di rispondere all'esposizione tramite una rapida espulsione dei batteri dai propri tessuti o tramite l'attivazione di una risposta immunitaria mediata da componenti dell'emolinfa. In letteratura è riportato che l'attività battericida dell'emolinfa di *M. galloprovincialis*, nei confronti di *Vibrio* spp. è dose dipendente, più è alta la concentrazione batterica più si riduce tale attività tanto che a concentrazioni superiori a 5×10^7 CFU/ml la battericidia non è significativa (Balbi et al., 2019).

Studi recenti indicano che la presenza di concentrazioni molto basse di antibiotici, al di sotto delle MIC conosciute, sono sufficienti per la selezione di un fenotipo di resistenza in determinate circostanze. Uno studio di Jutkina et al., 2018, in cui sono stati utilizzati ceppi batterici isolati da effluenti fognari

come cellule donatrici e un ceppo di *E. coli* come ricevente, ha dimostrato che la presenza di tetraciclina ad una concentrazione di 10 µg/ml (1/150 della MIC del ricevente) promuove eventi di HGT di determinanti di multi-resistenza.

In un ulteriore studio di Scornec et al., 2017 è stata dimostrata la capacità di circa 60 molecole appartenenti a varie classi di antibiotici di promuovere l'attivazione di promotori implicati nel trasferimento di elementi genetici mobili come il *Tn916* nonostante questo non presenti determinanti di resistenza affini e non conferisca alcun vantaggio selettivo contro i farmaci testati.

Sulla base di queste osservazioni, in questo lavoro si è cercato di valutare come la presenza di concentrazioni sub-MIC di florfenicolo potesse influenzare la frequenza di coniugazione tramite saggi *in vitro* ed *in vivo* in *Mytilus galloprovincialis*. *In vitro*, le frequenze di coniugazione aumentavano in maniera inversamente proporzionale all'aumento della concentrazione di florfenicolo testato suggerendo che concentrazioni sub-MIC di antibiotico sono in grado di stimolare il passaggio del plasmide contenente il gene *poxA*. Negli esperimenti *in vivo*, invece, la frequenza di coniugazione osservata dopo 24 ore è risultata essere molto bassa sia in acqua che nei mitili ma se nel primo caso la presenza dell'antibiotico sembra non influire sul processo di coniugazione, nel secondo caso sembra leggermente diminuirla.

Alcune evidenze dimostrano che i mitili della specie *M. galloprovincialis* rispetto ad altri bivalvi risultano essere resistenti alle infezioni batteriche nonostante siano costantemente esposti a milioni di microrganismi potenzialmente patogeni. Questa resistenza è probabilmente legata allo sviluppo di un sistema immunitario innato molto efficiente. Tuttavia le conoscenze in questo ambito sono ancora molto limitate (Figueras et al., 2019). Un team di ricercatori ha recentemente dimostrato che la diversa suscettibilità alle infezioni esibita da *C. gigas* (ostrica) e *M. galloprovincialis* dipende, almeno in parte, dalla diversa capacità di eliminare i patogeni mediante l'azione combinata di componenti cellulari (emociti) e solubili dell'emolinfa (Vezzulli et al., 2018).

Tuttavia, molti microrganismi sembrano essere resistenti all'attività battericida dell'emolinfa e questo spiegherebbe la loro persistenza nei tessuti dei mitili. In uno studio di Antunes et al., 2014 ad esempio è stata testata l'attività battericida dell'emolinfa di *A. cygnea* nei confronti di ceppi multiresistenti di *E. coli* ed enterococchi tramite saggi *in vitro* e *in vivo*. I risultati hanno evidenziato una maggiore suscettibilità degli enterococchi rispetto ad *E. coli* all'esposizione all'emolinfa.

Alla luce di queste evidenze, in questo lavoro di tesi è stata valutata l'attività battericida dell'emolinfa eseguendo saggi di coniugazione *in vitro* in presenza

di concentrazioni sub-MIC di antibiotico utilizzando l'emolinfa stessa come mezzo di incubazione dei ceppi donatore e ricevente.

Dai risultati emerge che sia il ceppo donatore che ricevente sono in grado di sopravvivere in emolinfa nei tempi testati, suggerendo l'esistenza di meccanismi di resistenza degli enterococchi all'attività battericida dell'emolinfa e come osservato in letteratura per *Vibrio* anche per *E. faecium* la resistenza all'attività battericida dell'emolinfa sembra correlata alla concentrazione batterica. Inoltre, la frequenza di coniugazione diminuiva nel tempo ed era influenzata in modo variabile dalle diverse concentrazioni di antibiotico. Poiché il numero di cellule batteriche di donatore e ricevente rimaneva comunque costante in emolinfa, la riduzione della frequenza di coniugazione non sembrava dovuta al killing dei batteri da parte degli emociti. Probabilmente anche se le cellule non vengono uccise, emociti e altri componenti dell'emolinfa potrebbero interferire con il metabolismo e i processi biosintetici dei batteri e, di conseguenza, interferire con il processo di coniugazione. La presenza delle due concentrazioni sub-MIC di antibiotico sembrava in alcuni casi stimolare il passaggio di materiale genetico (a T₃ e a T₅). I risultati ottenuti sono comunque difficilmente interpretabili quindi sarà opportuno confermarli.

La conferma dell'identità dei transconiuganti è stata ottenuta in tutti i casi mediante analisi fenotipica (determinazione della MIC) e genotipica (PCR, S1-PFGE, SmaI-PFGE), confermando l'acquisizione della resistenza agli oxazolidinoni mediante trasferimento di un plasmide di circa 140 kb dal donatore al ricevente.

6. BIBLIOGRAFIA

Anthony, W. E., Burnham, C.-A. D., Dantas, G., & Kwon, J. H. (2020). The Gut Microbiome as a Reservoir for Antimicrobial Resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 223(Suppl 3), S209–S213. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa497>

Antimicrobial resistance. (s.d.). Recuperato 4 giugno 2024, da <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Antunes, F., Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Vaz-Pires, P., Ferreira, S., Domingues, B., Machado, J., & Martins da Costa, P. (2014). Antibacterial effects of *Anodonta cygnea* fluids on *Escherichia coli* and enterococci multi-drug-resistant strains: Environmental implications. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(6), 880–889. <https://doi.org/10.1080/02772248.2014.989853>

Balbi, T., Auguste, M., Cortese, K., Montagna, M., Borello, A., Pruzzo, C., Vezzulli, L., & Canesi, L. (2019). Responses of *Mytilus galloprovincialis* to challenge with the emerging marine pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.011>

Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C., & Poeta, P. (2011). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic

resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? *Marine Pollution Bulletin*, 62(6), 1245–1248.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.021>

Bender, J. K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T. M., Westh, H., Hammerum, A. M., Schaffer, K., Burns, K., Murchan, S., Novais, C., Freitas, A. R., Peixe, L., Del Grosso, M., Pantosti, A., & Werner, G. (2018). Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 40, 25–39.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.10.002>

Bengtsson-Palme, J., Jonsson, V., & Heß, S. (2021). What Is the Role of the Environment in the Emergence of Novel Antibiotic Resistance Genes? A Modeling Approach. *Environmental Science & Technology*, 55(23), 15734–15743. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02977>

Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., & Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research*, 130, 338–365. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

Bombaywala, S., Mandpe, A., Paliya, S., & Kumar, S. (2021). Antibiotic resistance in the environment: A critical insight on its occurrence, fate, and ecotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(20), 24889–24916. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13143-x>

Briancesco, R. (s.d.). *Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali.*

Burgos-Aceves, M. A., & Faggio, C. (2017). An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: Physiology and molecular aspects. *Fish & Shellfish Immunology*, *67*, 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.042>

Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *76*(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015).** Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(1), 81–95. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>
- Cattaneo, P., & Bernardi, C. (2010).** Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi. *Food In*, *1*(01), Articolo 01. <https://doi.org/10.13130/2039-1544/529>
- Ciacci, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P., & Canesi, L. (2009).** Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *153*(4), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.04.007>
- Cinhi, M., Coccitto, S. N., Morroni, G., D’Achille, G., Brenciani, A., & Giovanetti, E. (2022).** Detection of an *Enterococcus faecium* Carrying a Double Copy of the PoxTA Gene from Freshwater River, Italy. *Antibiotics*, *11*(11), 1618. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111618>
- Clardy, J., Fischbach, M., & Currie, C. (2009).** The natural history of antibiotics. *Current biology: CB*, *19*(11), R437–R441. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>

Cooke, M. B., & Herman, C. (2023). Conjugation's Toolkit: The Roles of Nonstructural Proteins in Bacterial Sex. *Journal of Bacteriology*, *205*(3), e0043822. <https://doi.org/10.1128/jb.00438-22>

Costa, T. R. D., Harb, L., Khara, P., Zeng, L., Hu, B., & Christie, P. J. (2021). Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Molecular microbiology*, *115*(3), 436–452. <https://doi.org/10.1111/mmi.14670>

Culyba, M. J., Mo, C. Y., & Kohli, R. M. (2015). Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*, *54*(23), 3573–3582. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00109>

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244, 114006. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>

Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: Cell–cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1185–1193. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2043>

Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., & Declercq, A. M. (2020). The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Scientific Reports*, 10(1), 6773. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62933-9>

eucast: New S, I and R definitions. (s.d.). Recuperato 7 giugno 2024, da <https://www.eucast.org/newsiandr>

Fajardo, A., Martínez-Martín, N., Mercadillo, M., Galán, J. C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tümmler, B., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2008). The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*, *3*(2), e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>

Figueras, A., Moreira, R., Sendra, M., & Novoa, B. (2019). Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment. *Fish & Shellfish Immunology*, *90*, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.064>

Fioriti, S., Coccitto, S. N., Cedraro, N., Simoni, S., Morroni, G., Brenciani, A., Mangiaterra, G., Vignaroli, C., Vezzulli, L., Biavasco, F., & Giovanetti, E. (2021). Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(9), e02958-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02958-20>

Fleming, L. E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S. A., Smith, S., Gabriele, H. S., & Walsh, P. (2006). Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, *53*(10–12), 545–560. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.012>

Frankel, G., David, S., Low, W. W., Seddon, C., Wong, J. L. C., & Beis, K. (2023). Plasmids pick a bacterial partner before committing to conjugation. *Nucleic Acids Research*, *51*(17), 8925–8933. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad678>

Gabibov, A. G., Dontsova, O. A., & Egorov, A. M. (2020). Overcoming Antibiotic Resistance in Microorganisms: Molecular Mechanisms. *Biochemistry (Moscow)*, *85*(11), 1289–1291. <https://doi.org/10.1134/S0006297920110012>

García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The Enterococcus: A Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>

Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2013). Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, *70*(3), 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.09.005>

Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2014). Conjugation in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology Spectrum*, *2*(4), 10.1128/microbiolspec.plas-0004–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0004-2013>

Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, *107*(4), 455–471. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>

Grohmann, E., Muth, G., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(2), 277–301. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003>

Hart, J. J., Jamison, M. N., Porter, A. M., McNair, J. N., Szlag, D. C., & Rediske, R. R. (2024). Fecal Impairment Framework, A New Conceptual Framework for Assessing Fecal Contamination in Recreational Waters. *Environmental Management*, *73*(2), 443–456. <https://doi.org/10.1007/s00267-023-01878-x>

Heim, A. von B. T., Janice, J., Bjørnholt, J. V., Lunestad, B. T., Hegstad, K., & Svanevik, C. S. (2023). Genomic insights into *Enterococcus faecium* isolates from marine bivalves highlight One Health concerns and healthcare linkages. *Microbial Genomics*, *9*(12), 001154. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001154>

Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049–1070. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>

Jutkina, J., Marathe, N. P., Flach, C.-F., & Larsson, D. G. J. (2018). Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment*, 616–617, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312>

Jutkina, J., Rutgersson, C., Flach, C.-F., & Joakim Larsson, D. G. (2016). An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *Science of The Total Environment*, 548–549, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.044>

Karvanen, M., & Cars, O. (2024). The language of antimicrobial and antibiotic resistance is blocking global collective action. *Infectious Diseases*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23744235.2024.2332455>

Korajkic, A., Wanjugi, P., Brooks, L., Cao, Y., & Harwood, V. J. (2019). Persistence and Decay of Fecal Microbiota in Aquatic Habitats. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 83(4), e00005-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-19>

Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

Marino, A., Lombardo, L., Fiorentino, C., Orlandella, B., Monticelli, L., Nostro, A., & Alonzo, V. (2005). Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.003>

Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*, 321(5887), 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>

Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>

Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., & Sánchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 44–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x>

McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>

Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ph16111615>

Mutuku, C., Gazdag, Z., & Melegh, S. (2022). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: Resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 152. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03334-0>

Oyarzún, P. A., Toro, J. E., Nuñez, J. J., Ruiz-Tagle, G., & Gardner, J. P. A. (2024). The Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) in Chile: Distribution and Genetic Structure of a Recently Introduced Invasive Marine Species. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 14(6), 823. <https://doi.org/10.3390/ani14060823>

Panebianco, A., Rey-Campos, M., Romero, A., Diz, A. P., Novoa, B., & Figueras, A. (2023). *Mytilus galloprovincialis* releases immunologically functional haemocytes to the intervalvar space in response to tissue injury and infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 138, 108806. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108806>

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. [https://doi.org/10.1128/CMR.00088-](https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17)

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Rodrigues, C., & Cunha, M. Â. (2017). Assessment of the microbiological quality of recreational waters: Indicators and methods. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 2(1), 25. <https://doi.org/10.1007/s41207-017-0035-8>

S. R., K. S., & G., S. T. (2023). Antimicrobial Resistance in Marine Ecosystem: An Emerging Threat for Public Health. In M. P. Mothadaka, M. Vaiyapuri, M. Rao Badireddy, C. Nagarajrao Ravishankar, R. Bhatia, & J. Jena (A c. Di), *Handbook on Antimicrobial Resistance: Current Status, Trends in Detection and Mitigation Measures* (pp. 1–28). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9723-4_6-1

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

Sass, P. (2023). Antibiotics: Precious Goods in Changing Times. In P. Sass (A c. Di), *Antibiotics: Methods and Protocols* (pp. 3–26). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2855-3_1

Scornec, H., Bellanger, X., Guilloteau, H., Groshenry, G., & Merlin, C. (2017). Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx202>

Searcy, R. T., Phaneuf, J. R., & Boehm, A. B. (2023). High-frequency fecal indicator bacteria (FIB) observations to assess water quality drivers at an enclosed beach. *PLOS ONE*, 18(6), e0286029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286029>

Selleck, E. M., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>

Shan, X., Li, X.-S., Wang, N., Schwarz, S., Zhang, S.-M., Li, D., & Du, X.-D. (2020). Studies on the role of IS1216E in the formation and dissemination of poxtA-carrying plasmids in an *Enterococcus faecium* clade A1 isolate. *The*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 75(11), 3126–3130.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkaa325>

Shan, X., Yang, M., Wang, N., Schwarz, S., Li, D., & Du, X.-D. (2022). Plasmid Fusion and Recombination Events That Occurred during Conjugation of *poxtA*-Carrying Plasmids in Enterococci. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e0150521. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01505-21>

Singh, A. K., Kaur, R., Verma, S., & Singh, S. (2022). Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes in Water Bodies: Pollution, Risk, and Control. *Frontiers in Environmental Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.830861>

Stec, J., Kosikowska, U., Mendrycka, M., Stępień-Pyśniak, D., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Bębnowska, D., Hrynkiewicz, R., Ziętara-Wysocka, J., & Grywalska, E. (2022). Opportunistic Pathogens of Recreational Waters with Emphasis on Antimicrobial Resistance—A Possible Subject of Human Health Concern. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12), 7308. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127308>

Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>

Tiwari, A., Oliver, D. M., Bivins, A., Sherchan, S. P., & Pitkänen, T. (2021). Bathing Water Quality Monitoring Practices in Europe and the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5513. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115513>

Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Of animal origin. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.arba-0032–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0032-2018>

Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., & Pruzzo, C. (2018). Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial Ecology*, 75(2), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6>

Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., & Biavasco, F. (2011). Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus*

faecium. *Current Microbiology*, 62(5), 1438–1447.
<https://doi.org/10.1007/s00284-011-9880-x>

Waksman, G. (2019). From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: A mechanistic biology perspective. *EMBO Reports*, 20(2), e47012.
<https://doi.org/10.15252/embr.201847012>

Wang, Q., Peng, K., Liu, Z., Li, Y., Xiao, X., Du, X.-D., Li, R., & Wang, Z. (2023). Genomic insights into linezolid-resistant Enterococci revealed its evolutionary diversity and *poxTA* copy number heterogeneity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 62(4), 106929.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106929>

Xu, N., Qiu, D., Zhang, Z., Wang, Y., Chen, B., Zhang, Q., Wang, T., Hong, W., Zhou, N.-Y., Penuelas, J., Gillings, M., Zhu, Y.-G., & Qian, H. (2023). A global atlas of marine antibiotic resistance genes and their expression. *Water Research*, 244, 120488. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120488>