



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE
DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA
Curriculum Tecnologie Biologiche

***PRIMA SEGNALAZIONE DEL GENE DI RESISTENZA A
FENICOLI E OXAZOLIDINONI *optrA* IN AEROCOCCUS
VIRIDANS ISOLATO DA FECI BOVINE***

**FIRST DETECTION OF PHENICOL-OXAZOLIDINONE
RESISTANCE GENE *optrA* IN *AEROCOCCUS VIRIDANS*
FROM BOVINE FAECES**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Elena Simoncini

Relatore:

Prof.ssa Eleonora Giovanetti

Sessione Autunnale (Ottobre)

Anno Accademico 2020/2021

“Mi apro alla chiusura”

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il genere <i>Aerococcus</i>	7
1.1.1 Difficoltà di identificazione	9
1.1.2 Sensibilità agli antibiotici	12
1.1.3 Infezioni da <i>A. viridans</i>	13
1.2 Oxazolidinoni	15
1.2.1 Linezolid	18
1.2.2 Tedizolid	21
1.2.3 Meccanismo d'azione degli oxazolidinoni	23
1.3 Meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni	25
1.3.1 Mutazioni dell'rRNA 23S	26
1.3.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3 e L4	29
1.3.3 Il gene <i>cfr</i>	33
1.3.4 Il gene <i>cfr</i> (B)	36
1.3.5 Il gene <i>cfr</i> (C)	38
1.3.6 Il gene <i>cfr</i> (D)	40

1.3.7 Il gene <i>cfr</i> (E)	41
1.3.8 Il gene <i>optrA</i>	42
1.3.9 Co-localizzazione plasmidica di <i>cfr</i> e <i>optrA</i>	47
1.3.10 Il gene <i>poxtA</i>	49
2. MATERIALI E METODI	54
2.1 Isolamento del ceppo di <i>A. viridans optrA</i> -positivo	54
2.2 Test di Sensibilità	56
2.3 Estrazione DNA totale.....	58
2.4 Saggi di amplificazione	59
2.5 Saggi di trasferibilità	61
2.6 S1-PFGE	62
2.7 Southern blotting e ibridazione.....	65
2.8 Sequenziamento	66
3. RISULTATI.....	68
3.1 Test di sensibilità.....	68
3.2 Trasferibilità del gene <i>optrA</i>	69
3.3 Localizzazione genica	72
3.4 Caratterizzazione del plasmide <i>pAv-optrA</i>	73

3.6 Capacità del contesto genetico di <i>optrA</i> in <i>pAv-optrA</i> di escindere in forma circolare	80
4. DISCUSSIONE.....	81
5. BIBLIOGRAFIA.....	90

1. INTRODUZIONE

Gli antibiotici, fin dalla loro scoperta, hanno portato ad un netto miglioramento della qualità e della durata della vita, riuscendo a eradicare infezioni oggi considerate di lieve entità, ma che fino ad un secolo fa non erano trattabili.

Fu nel 1895 che per la prima volta Vincenzo Tiberio, un ufficiale medico del Corpo Sanitario della Marina Militare, descrisse il potere battericida di alcune muffe, anticipando di oltre trent'anni la scoperta della penicillina. Quest'ultima, infatti, venne caratterizzata da Alexander Fleming nel 1928, portando ufficialmente alla nascita degli antibiotici. La penicillina ebbe concreta applicazione alla fine degli anni '30 grazie ai ricercatori Ernst Chain e Howard Walter Florey, che riuscirono ad estrarre la penicillina ed iniziare le prime sperimentazioni animali; solo nel 1941 venne sperimentata su un essere umano e qualche anno dopo ne venne autorizzato l'utilizzo.

Ebbe quindi inizio la produzione industriale degli antibiotici e ne furono scoperti di nuovi, quali la streptomina, e le cefalosporine, la cui identificazione si deve a Giuseppe Brotzu, un farmacologo che studiando le acque contaminate dagli scarichi fognari del porto di Cagliari, isolò la colonia batterica da cui alla fine degli anni '40 nacque tutta la linea delle cefalosporine. Da allora molti altri antibiotici furono identificati e largamente impiegati nel trattamento delle infezioni: il cloramfenicolo, le tetracicline, i glicopeptidi, i fluorochinoloni.

La mortalità associata alle infezioni è stata drasticamente ridotta; tuttavia oggi, i grandi progressi raggiunti in ambito clinico sono messi a serio rischio a causa dell'insorgenza di antibiotico-resistenze in rilevanti patogeni umani, sia in ambito ospedaliero che comunitario. Il fenomeno della resistenza risulta amplificato e accelerato dall'uso eccessivo e improprio, sia in medicina umana che veterinaria, degli antibiotici, che esercitando forti pressioni selettive sulla popolazione microbica, possono produrre effetti deleteri sulla salute degli esseri umani e degli animali, a causa della perdita di efficacia delle terapie. Procedure mediche che diamo per scontate da settant'anni rischiano di diventare pericolose o

improponibili; ad esempio operazioni chirurgiche, trapianti e chemioterapia (riduce le difese immunitarie e necessita di terapie protettive per evitare infezioni letali). In particolare desta preoccupazione, lo sviluppo di ceppi multi-resistenti (MDR) ed estesamente resistenti (XDR) agli antibiotici.

Nel 2016 l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha stilato una lista dei principali batteri antibiotico-resistenti a livello globale per il loro monitoraggio e controllo; tra essi figurano batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemici e alle cefalosporine di terza generazione, enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA).

In Europa, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza viene monitorato del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC); annualmente fornisce il rapporto "Surveillance of antimicrobial resistance in Europe" che raccoglie i dati di antibiotico-resistenza relativi a un selezionato gruppo di patogeni (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp.), isolati da

infezioni invasive sia acquisite in ambito comunitario che associate all'assistenza sanitaria. L'ultimo rapporto disponibile, relativo all'anno 2019, descrive per le specie batteriche Gram-negative, una resistenza che continua a mantenersi a livelli elevati, in particolare per *K. pneumoniae* nei confronti di più classi di antibiotici; mentre per quanto riguarda i Gram-positivi, i ceppi MRSA rimangono una priorità di sanità pubblica in diversi paesi che hanno riportato percentuali di resistenza superiori al 25% (inclusa l'Italia). Il dato che però suscita maggiore preoccupazione è l'aumento della percentuale di resistenza alla vancomicina in *E. faecium* che è passata dal 10,5% nel 2015 al 18,3% nel 2019.

Dall'ultimo rapporto pubblicato dall' ECDC insieme all'Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA), relativo all'anno 2019 e riguardante i batteri zoonosici, emerge che le campilobatteriosi e le salmonellosi sono infezioni in gran parte resistenti agli antibiotici comunemente usati nell'uomo e negli animali. Ceppi MRSA, di origine sia comunitaria che ospedaliera, sono stati isolati da tutte le specie testate (suini, bovini, avicoli, cavalli e visoni) con frequenza variabile tra i vari paesi. Un dato preoccupante è anche la rilevazione della resistenza al linezolid, un antibiotico

utilizzato in medicina umana come “ultima risorsa” per il trattamento delle infezioni gravi e/o complicate da Gram-positivi quali: MRSA, VRE e diversi ceppi MDR.

In Italia, secondo quanto riportato dall’ISS (Istituto Superiore di Sanità) nel rapporto AR-ISS, la resistenza agli antibiotici si mantiene tra le più elevate in Europa e risulta, nella maggior parte dei casi, al di sopra della media europea; infatti nel nostro paese ogni anno, dal 7 al 10% dei pazienti va incontro a un’infezione sostenuta da batteri multiresistenti con migliaia di decessi. Ciò è coerente con i dati riportati dall’AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), che vedono l’Italia come uno dei maggiori consumatori di antibiotici a livello europeo. Inoltre, per valutare gli effetti della pandemia di COVID-19, è stata effettuata un’analisi comparativa relativa ai consumi di antibiotici in Italia nei primi mesi del 2020 rispetto ai primi sei mesi del 2019; i primi dati hanno già messo in evidenza una riduzione del 26,3% dell’uso di antibiotici nell’ambito dell’assistenza convenzionata e dell’1,3% per quanto riguarda gli acquisti diretti. Al contrario, prendendo in considerazione le strutture pubbliche è emerso un netto incremento degli acquisti di antibiotici, con un picco nel mese di marzo 2020

in cui tale indicatore è risultato raddoppiato rispetto allo stesso mese del 2019 [In particolare tra le categorie terapeutiche, si riscontra un elevato incremento per i macrolidi (+77%) e, tra questi, l'azitromicina registra un aumento del 160%].

Il quadro attuale della ricerca farmaceutica e dello sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici fornito dall'OMS attraverso i rapporti "Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline and its companion publication" e "Antibacterial agents in preclinical development", evidenzia che al momento ci sono 60 prodotti in via di sviluppo (50 antibiotici e 10 biologici). Il loro problema però è che portano scarsi benefici rispetto ai trattamenti esistenti, e solo pochi di essi sono mirati contro gli agenti patogeni più pericolosi citati precedentemente. Invece i candidati pre-clinici (test in fase iniziale) sono più innovativi, ma ci vorranno anni prima che possano essere somministrati a pazienti. Altro dato rilevante è che la ricerca e lo sviluppo di antibiotici sono principalmente guidati da piccole o medie imprese, mentre le grandi aziende farmaceutiche tendono ad abbandonare questo campo di ricerca, probabilmente scoraggiate dagli elevati costi di produzione seguiti da una rapida

insorgenza di resistenze che rendono vano lo sviluppo dei nuovi farmaci.

Poiché la resistenza è in aumento e pochi nuovi antibiotici sono stati scoperti e commercializzati negli ultimi anni, il problema della resistenza agli antibiotici è oggi una grave minaccia per la salute pubblica globale.

1.1 Il genere *Aerococcus*

Tassonomicamente il genere *Aerococcus* appartiene al phylum *Firmicutes*, ordine *Lactobacillales*, famiglia *Aerococcaceae*. Il genere è stato identificato per la prima volta nel 1953, da campioni di aria e polvere, come cocco Gram-positivo e catalasi-negativo che cresceva in piccoli *cluster* [1]. La prima specie ad essere isolata fu *Aerococcus viridans* e negli anni successivi furono pubblicati alcuni studi che dimostravano la sua capacità di causare, seppur raramente, diverse infezioni umane quali: endocarditi [2], osteomieliti [3] e artrite settica [4]. Tuttavia vennero isolati anche altri aerococchi, diversi da *A. viridans*, provenienti da infezioni del tratto urinario che vennero denominati *Aerococcus-like organisms*

(ALO) [5] e furono a lungo oggetto di studio portando, nel 1992, alla caratterizzazione della specie *Aerococcus urinae* [6]. Negli anni successivi vennero scoperte altre specie appartenenti al genere *Aerococcus* responsabili di infezioni umane: *Aerococcus christensenii*, isolato dal tratto vaginale; *Aerococcus urinaehominis*, isolato dall'urina umana; e *Aerococcus sanguinicola* isolato da campioni di sangue umano. Altre specie di aerococco provenivano da isolati animali: *Aerococcus suis* e *Aerococcus urinaeequi*.

Gli aerococchi possono colonizzare il tratto urinario e causare infezioni invasive specialmente in soggetti con patologie alle vie urinarie. Inoltre, è stato dimostrato che sono in grado di organizzarsi in biofilm e, in virtù di ciò, colonizzare superfici plastiche (es. cateteri urinari) [7]. Alcune specie (*A. urinae*) possono causare endocarditi in quanto, una volta entrate nel circolo sanguigno, sono in grado di aggregare piastrine e fibrina formando dei reticoli che si depositano nell'endotelio cardiaco. Tuttavia, i meccanismi di virulenza di questi microrganismi restano ancora poco conosciuti.

1.1.1 Difficoltà di identificazione

Solo negli ultimi dieci anni gli aerococchi sono stati riconosciuti patogeni clinici emergenti [8-9], principalmente a causa della loro errata identificazione come altre specie batteriche. Infatti, se isolate su agar sangue, le colonie di *Aerococcus* presentano alfa-emolisi e possono erroneamente essere scambiate per streptococchi alfa emolitici; invece, ad una identificazione preliminare al microscopio, le cellule di aerococco appaiono come cocci Gram-positivi organizzati in tetradi o cluster, portando così ad un errato iter diagnostico verso il genere *Staphylococcus* (Figura 1) [8]. Ciò che li distingue da questo genere è il fatto che gli aerococchi sono catalasi-negativi; quindi è possibile raggiungere una diagnosi corretta, ma il percorso è pieno di insidie. Inoltre, possiedono tratti comuni di antibiotico-resistenza con gli enterococchi.

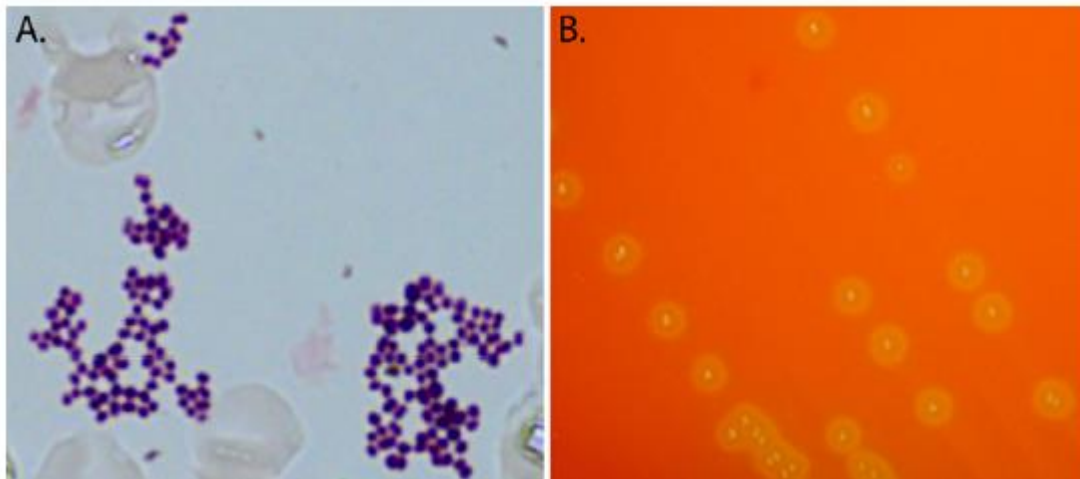


Figura 1. Morfologia di cellule e colonie di *Aerococcus*.

A) Cellule di *A. urinae* isolate da emocoltura positiva osservate al microscopio.

B) Colonie con alfa-emolisi su agar sangue dello stesso isolato.

Tratto da Rasmussen (2013).

Le varie specie di *Aerococcus* possiedono caratteristiche biochimiche simili e ciò impedisce la loro distinzione attraverso i test disponibili in commercio, basati sulle reazioni biochimiche [10]. Il gold-standard per l'identificazione a livello di specie è il sequenziamento del gene codificante l'rRNA 16S, ma è un metodo che richiede tempo e non idoneo per l'uso di routine in clinica. L'introduzione della tecnologia MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry) si è rivelata un metodo affidabile, rapido e sensibile per l'identificazione delle specie di *Aerococcus* [11], portando ad un

aumento della rilevazione di questi batteri in un ampio spettro di infezioni umane.

Nel 2016 è stato pubblicato uno studio sull'incidenza delle batteriemie da aerococco, da cui è emerso che *A. urinae* è la specie più comunemente responsabile di endocarditi infettive aerococciche e batteriemie, specialmente negli anziani con problemi urologici e soggetti a infezioni urinarie [12]. Inoltre, è stato dimostrato che l'incidenza delle batteriemie causate da *A. urinae* e *A. sanguinicola* è molto più elevata di come descritto in studi precedenti all'introduzione del MALDI-TOF in microbiologia per l'identificazione dei microorganismi patogeni. Le emocolture di diversi pazienti con batteriemie da *A. urinae* e *A. sanguinicola*, presentavano anche altre specie batteriche tipiche della flora intestinale, suggerendo che queste due specie potrebbero avere il loro normale habitat nell'intestino. Ciò coincide con quanto emerso da studi precedenti sulla capacità di *A. viridans* di produrre batteriocine, funzione importante per un batterio che deve competere con altre specie come nella normale flora microbica [13].

In ogni caso l'habitat degli aerococchi non è del tutto conosciuto e non sono ancora chiari i meccanismi di virulenza.

1.1.2 Sensibilità agli antibiotici

Soltanto recentemente l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ha stabilito i breakpoints clinici specie-specifici per gli aerococchi; prima della disponibilità di questi dati la microdiluizione in brodo, effettuata per determinare il valore di MIC, veniva interpretata utilizzando i breakpoints stabiliti per i batteri correlati (*Streptococcus viridans*).

La sensibilità agli antibiotici varia leggermente tra le diverse specie, ma in generale gli aerococchi sono sensibili ai β -lattamici, alle cefalosporine e alla vancomicina. In particolare *A. viridans* mostra valori di MIC più elevati ai β -lattamici rispetto alle altre specie, infatti sono stati riportati casi di resistenza alla penicillina [14]. Inoltre, gli aerococchi mostrano una bassa resistenza agli aminoglicosidi e MIC di fluorochinoloni relativamente alte, specialmente la specie *A. sanguinicola*. Per quanto riguarda la specie *A. urinae*, studi sui valori di MIC hanno mostrato sensibilità

alla fosfomicina e (nella maggior parte dei casi) alla clindamicina. Gli aerococchi presentano bassi valori di MIC di cloramfenicolo, linezolid, rifampicina e doxiciclina, antibiotici che hanno un utilizzo limitato in clinica per le infezioni da aerococco, ma efficaci in vitro. Per il trattamento delle infezioni del tratto urinario (UTI) non complicate è suggerito l'utilizzo di nitrofurantoina, mentre per le UTI complicate il trattamento con amoxicillina rappresenta la prima scelta [9]. In ogni caso l'antibiogramma è di primaria importanza per determinare quale sia l'antibiotico più idoneo per un rapido trattamento delle infezioni aerococciche.

1.1.3 Infezioni da *A. viridans*

A. viridans rappresenta la specie di riferimento del genere *Aerococcus*. Viene isolato meno frequentemente nelle infezioni umane, rispetto a *A. urinae* e *A. sanguinicola*, e spesso si trova insieme ad altri patogeni minori [12]. Ciò suggerisce che *A. viridans* sia per lo più un contaminante delle emocolture; ipotesi avvalorata dal fatto che vari ceppi si trovano spesso nella polvere e in ambiente ospedaliero. Sono stati riportati casi in cui *A. viridans*

si è dimostrato responsabile di setticemia, causata da infezione al tratto urinario, e infezioni nosocomiali del tratto urinario successive ad interventi operatori, anche in pazienti giovani [15], [16]). Le infezioni sono state eradicate mediante terapia con amoxicillina e vancomicina dopo antibiogramma e in tutti i casi è stato osservato che i ceppi di *A. viridans* erano resistenti ai principali antibiotici utilizzati per il trattamento delle UTI non complicate. Da questi casi è emersa l'importanza di una rapida ed accurata identificazione del genere *Aerococcus*, per iniziare subito una terapia antibiotica efficace; infatti se non trattate le infezioni da *A. viridans* possono portare a severe complicanze e infine alla morte. Inoltre è importante sottolineare che le infezioni umane da *A. viridans* sono ancora poco comuni, ma più frequenti di quanto ritenuto in passato.

Invece in ambito veterinario sono stati riportati casi di infezioni da *A. viridans* sia in animali acquatici (aragoste) che in animali da allevamento (ovini e suini). In particolare, *A. viridans* è stato riconosciuto come patogeno del tratto urinario anche nei maiali [17]. La caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati in questo studio ha rivelato un'elevata eterogeneità genetica (emersa anche

in studi precedenti) che sembra essere una particolarità di *A. viridans*.

Più recentemente questo microrganismo si è dimostrato anche agente eziologico emergente di casi di mastite bovina, portando ad una diminuzione della produzione giornaliera di latte ed alterazione delle sue componenti [18]. I ceppi di *A. viridans* isolati in questi studi si sono rivelati altamente sensibili ai β -lattamici, eritromicina e vancomicina, ma resistenti ad aminoglicosidi, tetracicline e, in qualche caso, ai macrolidi che sono antibiotici ampiamente utilizzati in veterinaria.

Tuttavia ancora non ci sono dati concreti sulla prevalenza e sull'impatto di questi microrganismi sulla salute umana ed animale.

1.2 Oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni sono una classe di antibiotici caratterizzati dalla presenza di un gruppo 2-ossazolidinone, un composto organico eterociclico che deriva dall'ossidazione in posizione 2 di un anello ossazolidinico (Figura 2).

Il loro primo sviluppo avvenne nel 1987, quando i ricercatori della E.I. DuPont de Nemours & Company pubblicarono uno studio sull'attività antimicrobica in vitro e in vivo di questa nuova classe di farmaci [19], spinti dalla necessità di ricercare nuove molecole antimicrobiche in grado di contrastare la crescente antibiotico-resistenza, soprattutto nei Gram-positivi.

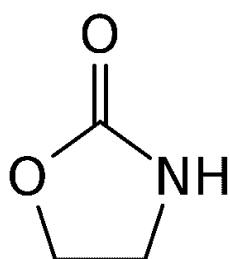


Figura 2. Struttura 2-ossazolidinone.

Dapprima gli oxazolidinoni suscitarono un primo interesse per la loro capacità di inibire le monoaminoossidasi (MAO), enzimi appartenenti alla famiglia delle ossidoreduttasi che ossidano le monoammine nelle corrispondenti aldeidi con liberazione di ammoniaca. La ricerca si concentrò sulle molecole Dup 721 e Dup 105 (Figura 3), che mostravano attività antimicrobica sia verso i Gram-positivi che verso i Gram-negativi, inibendo la sintesi

proteica. Inoltre queste prime molecole erano incapaci di generare mutanti resistenti *in vitro* e potevano essere somministrate per via orale. Per queste ragioni DuP 721 e DuP 105 entrarono velocemente nei trials clinici, ma risultarono tossiche, rendendo impossibile il loro utilizzo.

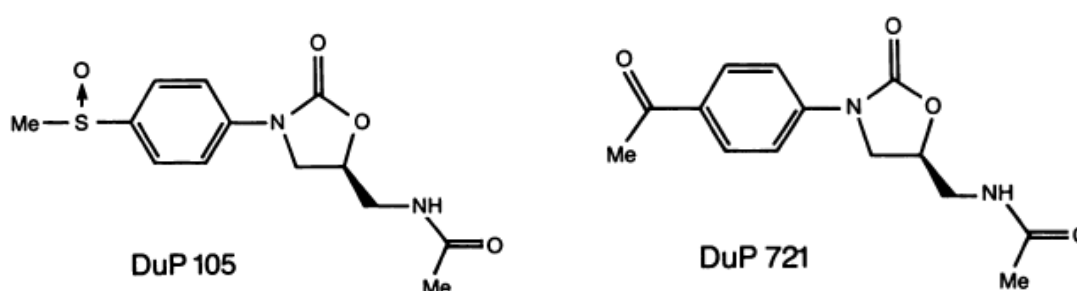


Figura 3. Molecole DuP 105 e DuP 721, precursori del linezolid.
Tratto da Slee *et al.*

La ricerca proseguì, finché nel 1996 vennero sintetizzati (a partire da DuP 721 e DuP 105) due derivati oxazolidinonici non tossici: linezolid ed eperezolid. Gli studi preclinici che seguirono dimostrarono che le due molecole avevano caratteristiche simili in termini di solubilità, potere antimicrobico e spettro d'azione. Tuttavia il linezolid mostrava una farmacocinetica migliore e per tale motivo raggiunse la fase clinica II [20], finché nel 2000 venne

approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso clinico. Nel 2014 è stato approvato il tedizolid per il trattamento di gravi infezioni cutanee e dei tessuti molli sostenute da Gram-positivi [21]. Ad oggi linezolid e tedizolid sono gli unici rappresentanti della classe degli oxazolidinoni.

1.2.1 Linezolid

Il linezolid (Zyvox ®) è stato il primo oxazolidinone ad essere approvato dalla FDA per il trattamento delle infezioni gravi sostenute dai Gram-positivi, quali: (i) polmoniti nosocomiali da *S. aureus* (incluso MRSA) e *Streptococcus pneumoniae*, (ii) infezioni/batteriemie da *E. faecium* vancomicina-resistente, (iii) infezioni complicate della pelle da *S. aureus*, (iv) polmonite comunitaria da *S. pneumoniae*, (v) meningiti da pneumococco penicillino-resistente [22]. Inoltre diversi studi hanno dimostrato che questo antibiotico può essere utilizzato come alternativa nel trattamento di pazienti con tubercolosi sostenuta da ceppi MDR e XDR [23].

Strutturalmente, il linezolid è formato da un eterociclo centrale ossazolidinico (gruppo A) al cui azoto è legato un gruppo N-arile (gruppo B) a sua volta legato ad un sostituente amino elettron-donatore con funzione stabilizzante (gruppo C); inoltre al C5 del gruppo A è presente una catena laterale con un gruppo acil-amino-metilico, che conferisce al farmaco una buona attività (Figura 4). Il gruppo N-arile e la configurazione S del C5 nel gruppo A, così come il gruppo acil-ammino-metilico legato al C5 del gruppo ossazolidinico, sono fondamentali per l'attività farmacologica. Il sostituente fluoro-aromatico e il gruppo morfolinico, sono responsabili rispettivamente di una maggiore biodisponibilità del farmaco e della farmacocinetica più favorevole. Entrambi i sostituenti vanno quindi ad aumentare la solubilità e ridurre gli effetti tossici del linezolid.

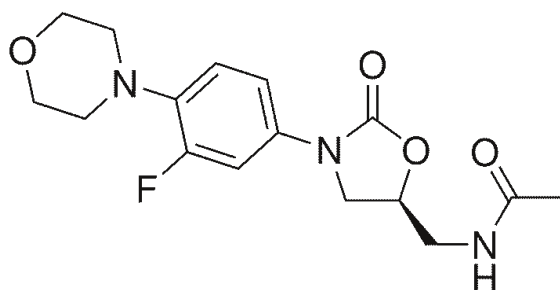


Figura 4. Struttura del linezolid.

Il linezolid agisce legandosi ad una fessura della subunità ribosomiale 50S, in particolare nel *Peptidyl Transferase Center* (PTC) a livello dell'rRNA 23S, in prossimità dei siti di legame del cloramfenicolo e altri antibiotici che agiscono sul ribosoma. In questo modo viene bloccata l'elongazione della catena peptidica, prevenendo la sintesi delle proteine batteriche. Può essere somministrato per via parenterale e orale, con un dosaggio consigliato di 600 mg ogni 12 ore che permette il raggiungimento della concentrazione plasmatica massima entro 2 ore dall'assunzione. Il linezolid viene rapidamente assorbito con una buona diffusione tissutale, emivita di 4-6 ore ed una biodisponibilità vicina al 100%; inoltre la farmacocinetica non è influenzata dall'assunzione di cibo. In pazienti con apparato renale sano, attraverso la clearance renale solo il 30% della dose viene escreta come farmaco inalterato nelle urine. Il restante viene eliminato sottoforma di due derivati inattivi dell'acido carbossilico, provenienti dall'ossidazione del gruppo morfolinico: acido aminoetossiacetico (PNU-142300) e idrossietil-glicina (PNU-142586). Per tale ragione, in pazienti con grave insufficienza

renale, il linezolid deve essere utilizzato con cautela e solo quando il beneficio previsto è considerato superiore al rischio teorico.

1.2.2 Tedizolid

Il tedizolid (Sivextro ®) è un oxazolidinone di seconda generazione approvato, nel 2014, per il trattamento di infezioni batteriche della pelle causate da Gram-positivi inclusi MRSA, VRE e fenotipi resistenti al linezolid. Questo antibiotico si è dimostrato essere dalle quattro alle otto volte più attivo del linezolid nei confronti dei suddetti patogeni [21].

Strutturalmente le differenze tra linezolid e tedizolid sono rappresentate in Figura 5. Il tedizolid è caratterizzato da una diversa catena laterale in posizione C5 dell'anello ossazolidinico, che presenta un gruppo idrossimetile responsabile della sua attività anche nei confronti di ceppi linezolid-resistenti. Al gruppo OH della catena laterale è legato un gruppo fosfato che, una volta in circolo, viene rimosso dalla fosfatasi alcalina, con aumento della solubilità e biodisponibilità del farmaco. Inoltre il tedizolid presenta un anello piridinico nel gruppo C e un gruppo D

aggiuntivo, costituito da metil-tetrazolo e ritenuto responsabile (insieme all'ottimizzazione del gruppo C) della sua maggiore affinità per il PTC della subunità ribosomiale 50S. Ciò si traduce in un maggiore potere antimicrobico.

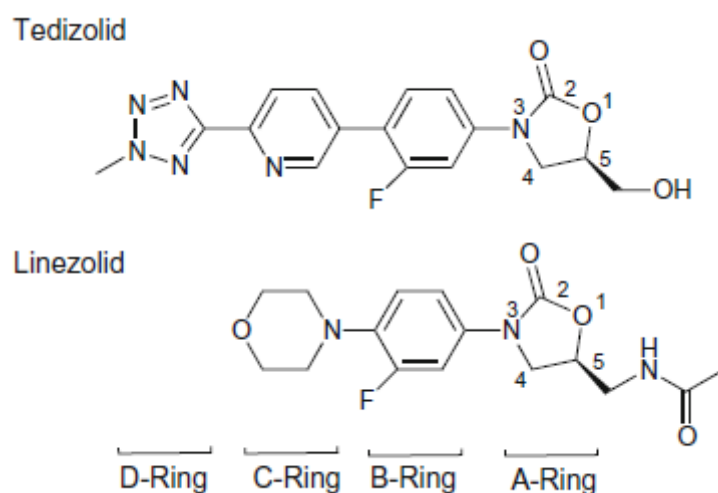


Figura 5. Differenze strutturali tra linezolid e tedizolid. Tratto da Zhanel *et al.*

Anche il tedizolid può essere somministrato per via orale o parenterale, ma presenta una maggiore emivita rispetto al linezolid (9-11 h) e per tale motivo la dose giornaliera consigliata è di 200 mg per 6 giorni. La biodisponibilità è > 90% e la massima concentrazione plasmatica viene raggiunta entro 3 ore dalla somministrazione [24]. Viene principalmente escreto dal fegato

come coniugato inattivo e solo il 18% viene eliminato nelle urine come farmaco inalterato.

1.2.3 Meccanismo d'azione degli oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni inibiscono la sintesi proteica attraverso il legame al PTC del ribosoma. Nel 1999 venne individuata per la prima volta l'esatta localizzazione del sito di legame del linezolid, attraverso studi condotti sull'archea *Halobacterium halobium* e le sue mutazioni dell'rRNA 23S [25]. In particolare venne ipotizzato che gli oxazolidinoni interagissero con il dominio V dell'rRNA 23S, interferendo con l'interazione iniziale del tRNA (legante la metionina) con la subunità ribosomiale 50S e impedendo così la formazione del complesso di inizio della traduzione 70S. Studi successivi, effettuati selezionando fenotipi resistenti di *Escherichia coli*, confermarono che mutazioni a carico del dominio V del ribosoma erano fondamentali nel ridurre l'efficacia degli oxazolidinoni [26]. La conferma definitiva che il linezolid agiva legandosi al PTC, arrivò grazie a studi cristallografici dell'interazione farmaco-ribosoma, condotti sull'archea

Haloarcula marismortui. Questo microrganismo, possedendo un'unica copia del gene per l'rRNA 23S, consentì di aggirare il problema dovuto alla ridondanza degli operoni codificanti gli rRNA [27]. Il PTC è localizzato all'interno della subunità ribosomiale 50S, nella parte inferiore della tasca in cui vanno a posizionarsi l'estremità 3' dell'amminoacil-tRNA e il peptidil-tRNA durante la sintesi proteica (Figura 6A).

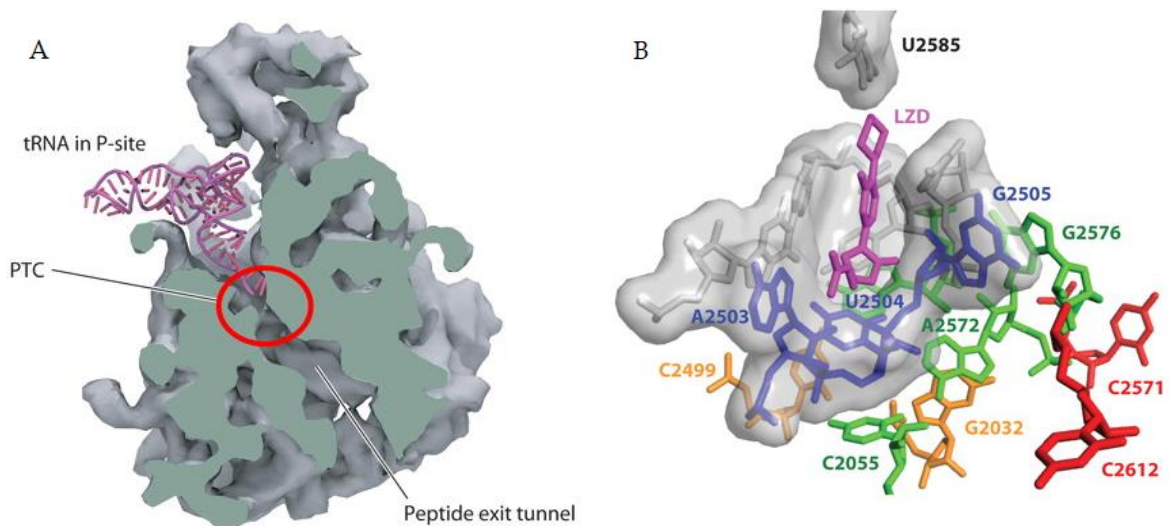


Figura 6. (A) Sezione sagittale della subunità maggiore del ribosoma batterico; il cerchio rosso evidenzia il PTC, mentre in viola è rappresentato il tRNA legato al sito P. (B) Ingrandimento del sito di legame del linezolid, ottenuto con il software Pymol. I nucleotidi coinvolti nel legame con il linezolid sono evidenziati con diversi colori: in blu sono mostrati i nucleotidi più vicini al sito di legame del linezolid (A2503, U2504, G2505); in verde, arancio e rosso quelli più lontani. Tratto da Long & Vester.

Inoltre lo studio di Long e Vester ha evidenziato che il legame del linezolid al sito A del ribosoma induce dei cambiamenti nella posizione dei nucleotidi del sito P e in particolare di U2585, un nucleotide molto conservato e responsabile del corretto posizionamento del tRNA nel sito P (Figura 6B). Il linezolid condivide parzialmente il sito di legame al ribosoma con altri antibiotici attivi sulla sintesi proteica come cloramfenicolo, clindamicina, tiamulina e streptogramina A. Questa è la ragione per cui si osserva resistenza crociata tra il linezolid e gli altri farmaci citati; tuttavia i siti di legame, pur essendo sovrapposti, non sono identici e di conseguenza cambia anche la modalità d'azione di queste molecole.

1.3 Meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni

Nonostante i primi studi effettuati sugli oxazolidinoni evidenziassero l'incapacità di queste molecole di generare mutanti resistenti *in vitro* [19], le prime resistenze al linezolid (associate a mutazioni) vennero riscontrate già dopo un anno dalla sua approvazione da parte dell'FDA [28]. I principali meccanismi di

resistenza sono riconducibili alla comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22, e all'acquisizione di determinanti di resistenza trasferibili (*cfr*, *poxA*, *optrA*). Questi ultimi suscitano preoccupazione poiché spesso sono localizzati su elementi genetici mobili e possono diffondere per trasferimento genico orizzontale.

1.3.1 Mutazioni dell'rRNA 23S

La resistenza al linezolid dovuta all'insorgenza di mutazioni a livello dell'rRNA 23S, in realtà fu evidenziata ancora prima dell'approvazione dell'antibiotico da parte della FDA [29]. Il dominio V dell'rRNA 23S nel PTC è formato dai nucleotidi conservati (G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585) con i quali il linezolid interagisce direttamente (Figura 7). Ceppi linezolid-resistenti hanno mostrato mutazioni a carico sia dei nucleotidi che interagiscono direttamente con l'antibiotico che di nucleotidi più lontani (A2062, G2447, A2453 C2499, U2500 e G2576), indicando che la resistenza non dipende dalla vicinanza al sito di legame del linezolid. In particolare, si è visto che le mutazioni G2576U e G2447U danno luogo a resistenze significative

[30]. Inoltre, lo screening di ceppi linezolid-resistenti ha consentito di chiarire che la mutazione G2576U è la più frequente negli stafilococchi e negli enterococchi e conferisce resistenza (in termini di MIC) correlata al numero di operoni che presentano mutazione [27]. Questa mutazione è anche la più frequentemente riportata negli isolati clinici ed è stata prevalentemente associata ad un prolungato trattamento con il linezolid.

Uno studio del 2010 ha evidenziato come la stessa mutazione dell'rRNA nel PTC può avere effetti diversi in batteri diversi e, oltre ad aumentare il livello di resistenza, provoca anche una cross-resistenza ad altri antibiotici che hanno lo stesso sito di legame [31].

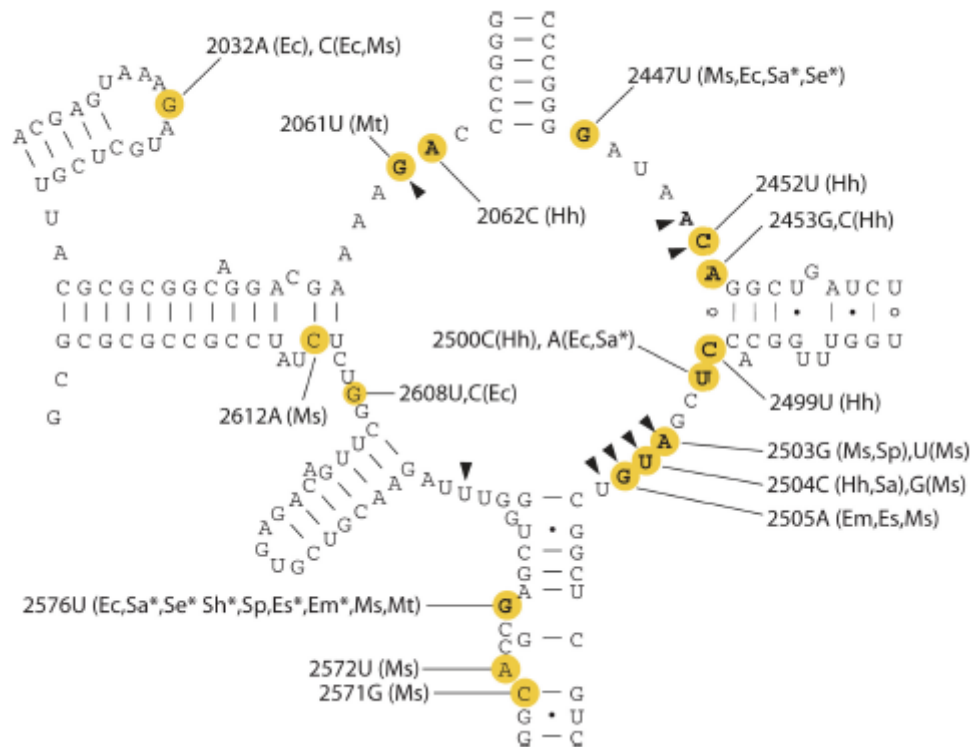


Figura 7. Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA 23S con evidenziati i siti che vanno in contro a mutazione (sequenza di *Mycobacterium smegmatis* e numerazione di *E. coli*). I triangoli neri indicano i nucleotidi che interagiscono con il linezolid. I cerchi gialli evidenziano i nucleotidi che vanno in contro a mutazione; i nucleotidi in grassetto rappresentano le mutazioni che conferiscono un incremento significativo della MIC di linezolid (>4 volte). Le mutazioni e gli organismi corrispondenti sono indicati con due lettere: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*Staphylococcus epidermidis*), Sh (*Staphylococcus haemolyticus*), Sp (*S. pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*M. smegmatis*), Mt (*Mycobacterium tuberculosis*), Hh (*H. halobium*). Gli asterischi indicano mutazioni descritte in ceppi di isolamento clinico. Tratto da Long & Vester.

1.3.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3 e L4

Oltre alle mutazioni dell'rRNA 23S, la resistenza agli oxazolidinoni è causata anche da mutazioni delle proteine ribosomiali L3 e L4. Queste due proteine sono localizzate nella subunità 50S del ribosoma; nello specifico, gran parte della proteina L3 si posiziona sulla superficie della subunità 50S e tramite una struttura a loop raggiunge l'interno del PTC, risultando molto vicina al sito di legame del linezolid (Figura 8). Anche la proteina L4 è associata al PTC, ma a livello del foro di uscita dei peptidi nascenti dal ribosoma.

Nel 2003, durante uno studio sulle basi geniche della resistenza alla tiamulina in *E. coli*, fu descritta la prima mutazione riguardante la proteina L3 [32]. La tiamulina è un antibiotico appartenente alla classe delle pleuromutiline, classe di farmaci che condivide lo stesso sito bersaglio del linezolid. Inoltre, venne osservato che mutazioni in L3 e L4 potevano essere indotte *in vitro* da elevate concentrazioni di linezolid e tedizolid [29]; tutto ciò ha indotto a ritenere che queste mutazioni potessero indurre resistenza a questi farmaci.

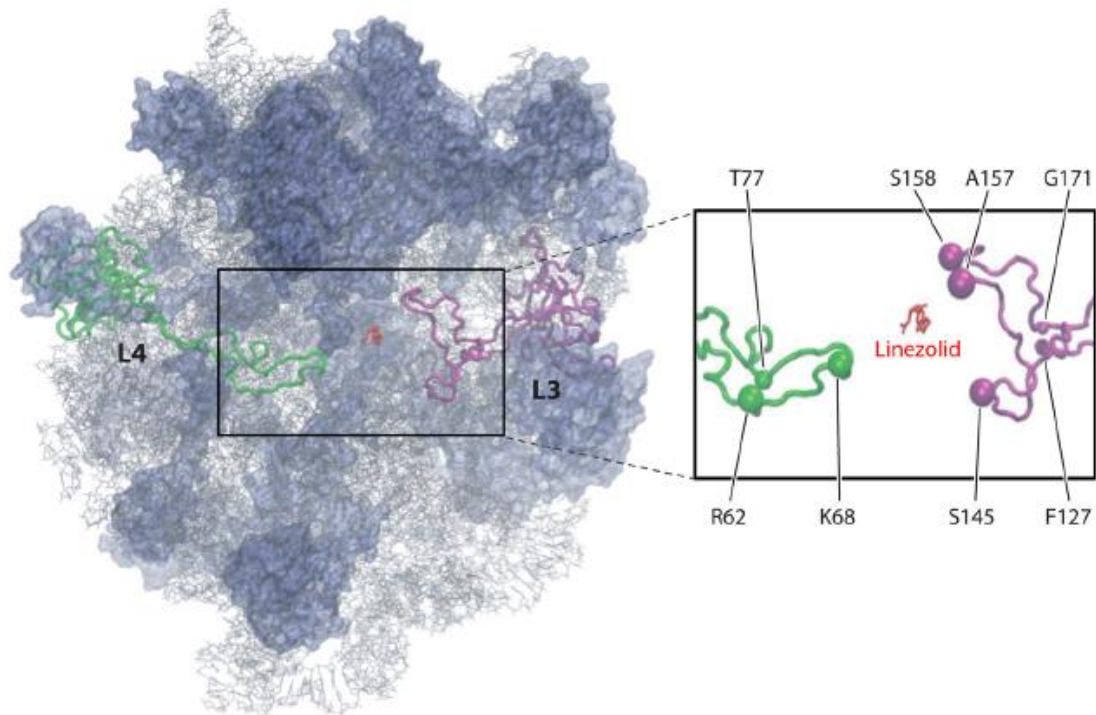


Figura 8. Rappresentazione della proteina L3 (viola) e L4 (verde) nel PTC vicino al sito di legame del linezolid (rosso). Tratto da Long & Vester.

Infatti, venne dimostrato che mutazioni in L3 e L4 erano in grado di determinare una ridotta sensibilità al linezolid sia da sole che in associazione con altri meccanismi di resistenza e sono state riportate in diversi isolati clinici (Tabella 1) [27].

In particolare le mutazioni F147L e A157R nella proteina L3 sembrano essere responsabili di elevati valori di MIC di linezolid. Per quanto riguarda la proteina L4 invece è stata trovata una delezione di sei nucleotidi nel gene codificante per questa proteina

in un ceppo di *S. pneumoniae* linezolid-resistente [33]. In ogni caso il reale contributo alla resistenza delle mutazioni della proteina L4 è ancora oggetto di studio, mentre la maggior parte delle mutazioni identificate si riscontra nella proteina L3 probabilmente per una sua maggiore vicinanza al PTC; frequentemente queste mutazioni sono associate a mutazioni dell'rRNA 23S.

Mutation	Organism	<i>D. radiodurans</i> L3 ^a	LZD distance ^b	Remarks ^c
L3				
ΔF127-H146	<i>S. aureus</i>	T113-K132		
G139R	<i>S. aureus</i>	G125	>25	C, T, 2576T
ΔS145	<i>S. aureus</i>	S131	>25	C
ΔS145/H146Y	<i>S. aureus</i>	S131/K132	>25/19.3	C, cfr
H146R/M156T	<i>Staphylococcus</i>	K132/G143	19.3/15.2	C, T, 2215A, 2576T, —, ^d L4-ins70G
H146Q/V154L/A157R	<i>Staphylococcus</i>	K132/I141/R144	19.3/22.1/7.0	C, T, —, ^d L4-ins70G, — ^e
F147I	<i>Staphylococcus</i>	K133 or W134	22.4 or >25	C, T, 2215A, 2576T, —, ^d L4-ins70G
F147L/A157R	<i>S. epidermidis</i>	K133 or W134/R144	22.4 or >25/7.0	C, —, ^d —, ^e L4-K68R/ ^e
G152D	<i>S. aureus</i>	G139	20.4	2447T
G152D	<i>S. aureus</i>	G139	20.4	C, T
G155R	<i>S. aureus</i>	G142	17.5	
G155R/M169L	<i>S. aureus</i>	G142/M156	17.5/>25	
A157R	<i>S. epidermidis</i>	R144	7.0	C, 2447T
S158F/D159Y	<i>S. epidermidis</i>	K145/T146	13.3/5.4	C, cfr, L3-L101V
S158Y/D159Y	<i>S. cohnii</i>	K145/T146	13.3/5.4	C, cfr, L4-N20S/A133T/V155I
ΔM169-G174	<i>S. aureus</i>	DM156-G161		C, cfr
L4				
N20S/A133T/V155I	<i>S. cohnii</i>	— ^f		C, cfr, L3-S158F/D159Y
ΔW65-R66	<i>S. pneumoniae</i>	Y59-G60	24.2-21.6	
ΔW65-R66	<i>S. pneumoniae</i>	Y59-G60	24.2-21.6	C, RE
ΔK68-G69	<i>S. pneumoniae</i>	K62-Q63	11.2-15.1	C, RE
K68N	<i>S. epidermidis</i>	K62	11.2	2576T
K68Q	<i>S. aureus</i>	K62	11.2	
G71D	<i>Clostridium perfringens</i>	G65	15.6	
ins71GGR72	<i>S. epidermidis</i>	G65/N66	15.6/16.1	2576T
L108S/ins71GGR72	<i>S. epidermidis</i>	L102	>75	2534T, — ^e

Tabella 1. Mutazioni in L3 e L4 associate alla linezolid-resistenza negli stafilococchi e in un isolato di *Clostridium perfringens*.

^a La sequenza di L3 di *Deinococcus radiodurans* è stata utilizzata per determinare le distanze degli aminoacidi mutati del sito di legame del linezolid. ^b La distanza indicata tra linezolid e i corrispondenti aminoacidi di *D. radiodurans* è la più piccola. ^c Informazioni aggiuntive: C isolato clinico, T trattamento con linezolid, cfr presenza del gene *cfr*, RE evidenza di resistenza. ^d L3-L101V, che non influenza la resistenza al linezolid. ^e L4N158S, che non influenza la resistenza al linezolid. ^f Nessun dato disponibile sugli allineamenti. Tratto da Long & Vester.

1.3.3 Il gene *cfr*

Il gene *cfr* (Cloramphenicol and Florfenicol Resistance) è stato il primo gene di resistenza trasferibile al linezolid ad essere identificato, nel 2000, in un ceppo di *Staphylococcus sciuri* di origine animale [34]. Questo gene era localizzato all'interno del plasmide pSCFS1, che conferiva resistenza a florfenicolo (FFC) e cloramfenicolo (CHL); tuttavia non mostrava omologia con i geni delle acetiltransferasi o delle proteine di efflusso, note per essere responsabili della resistenza a questi due antibiotici. Saggi di trasformazione, che utilizzarono un ceppo di *S. aureus* come ricevente, evidenziarono che le cellule trasformanti mostravano valori di MIC a FFC e CHL superiori rispetto al ceppo wild-type. Solo successivamente, grazie ad analisi di spettrometria di massa, venne chiarito che il gene *cfr* agiva codificando una metiltransferasi in grado di aggiungere un gruppo metile al C8 del nucleotide A2503 dell'rRNA 23S (Figura 9) [35]. Le proteine Cfr appartengono alla superfamiglia delle S-adenosilmetionine (SAM), coinvolte in processi di metilazione, isomerizzazione, ossidazione anaerobica e sintesi di poliammine; inoltre risultano essere le prime proteine SAM ad essere correlate a fenomeni di resistenza. Questa

metilazione, infatti, conferisce resistenza a cinque differenti classi di antibiotici: fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A (fenotipo PhLOPS_A), che hanno come bersaglio siti contigui, ma non identici, nel PTC [36].

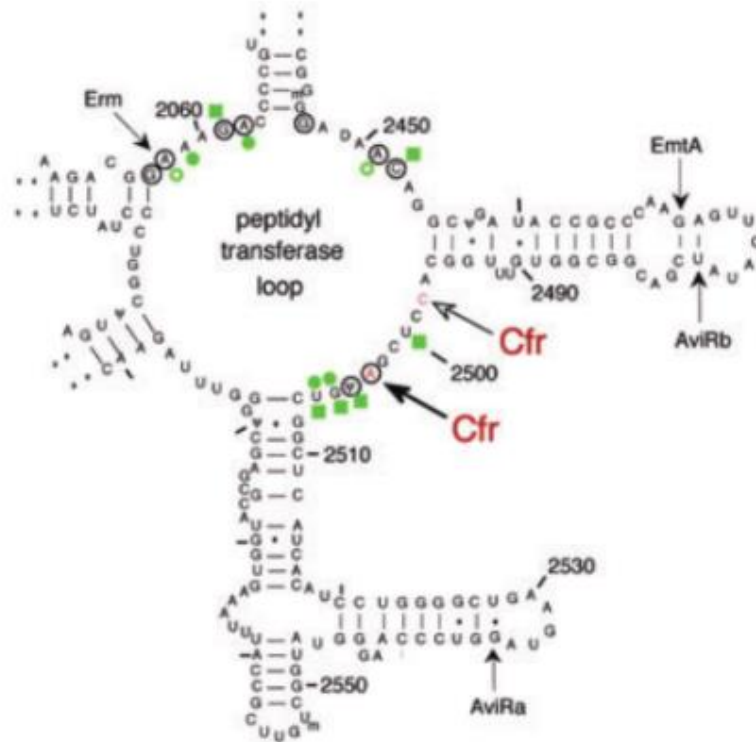


Figura 9. Struttura secondaria del dominio V dell'rRNA 23S di *E. coli*. I numeri indicano le posizioni dei nucleotidi; le frecce piene indicano i siti di metilazione che causano resistenza; la freccia vuota indica il nucleotide C2498. I nucleotidi che interagiscono con il CHL sono evidenziati con quadrati verdi. Sono cerchiati le posizioni delle mutazioni che conferiscono resistenza al CHL. Tratto da Kehrenberg *et al.*

In particolare è stato osservato che la metilazione indotta da Cfr crea un ingombro sterico nell' RNA 23S che ostacola il corretto

posizionamento del linezolid, ma non del tedizolid a causa della differente struttura della catena laterale dei due antibiotici [37]. Il gene *cfr* ha localizzazione principalmente plasmidica, ed è stato indentificato sia in generi Gram-positivi (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) che Gram-negativi (*Proteus* ed *Escherichia*) [38-39]. La diffusione di *cfr*, soprattutto tra le specie di stafilococco, è associata al fatto che questo gene è quasi sempre fiancheggiato da *Insertion Sequences* (IS) quali IS256, ISEnfa4, IS21-558 e IS1216, che ne rendono possibile l'inserzione in vari contesti genetici sia plasmidici che cromosomici (Figura 10) e l'eventuale associazione con altri determinanti di resistenza. Per quanto riguarda gli enterococchi invece, la presenza di *cfr* a localizzazione plasmidica è stata riportata nel 2012 in un ceppo di *E. faecalis* di origine animale [40] e da quel momento non è stata riscontrata una diffusione molto ampia negli enterococchi.

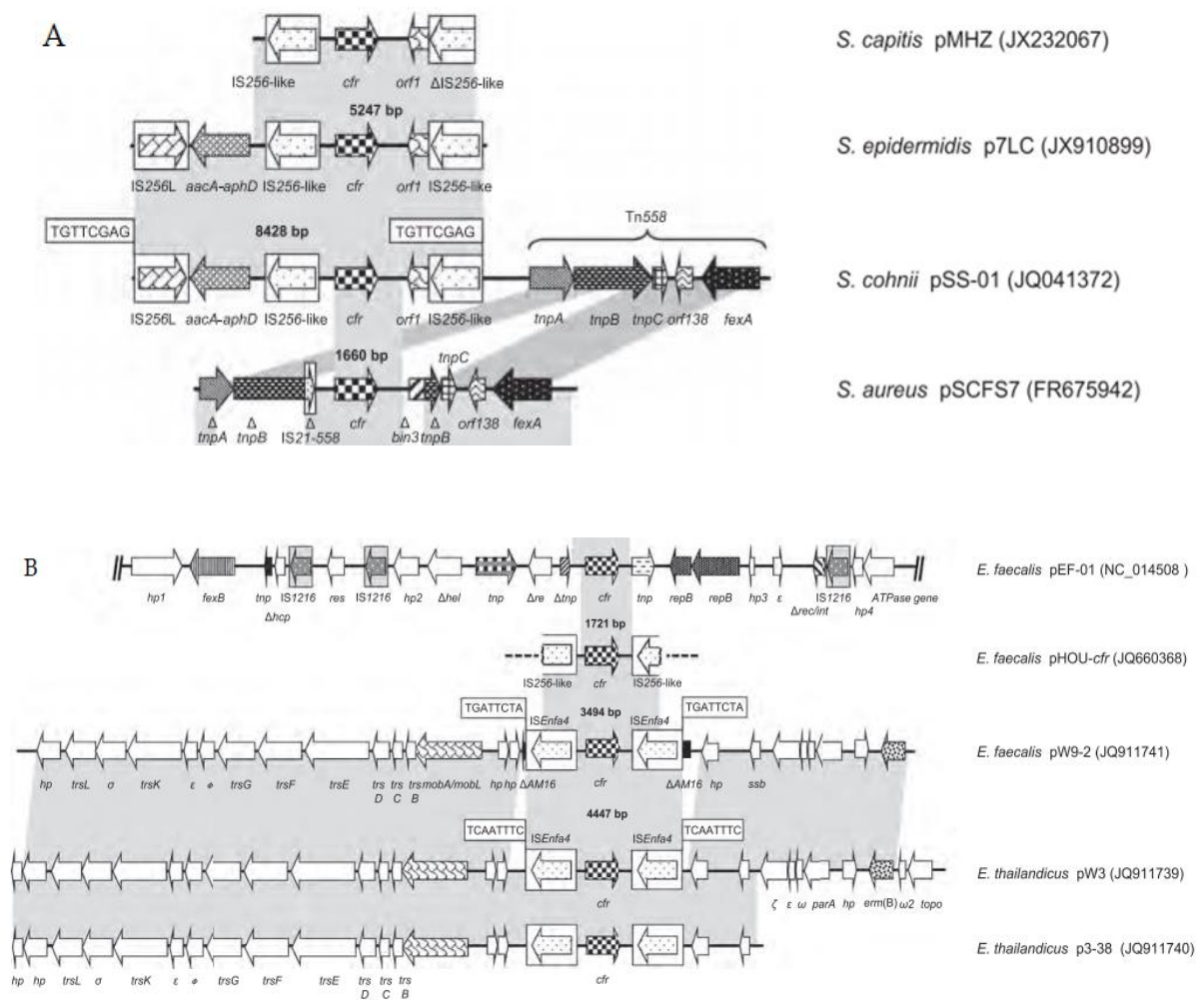


Figura 10. Confronto dei contesti genetici del gene *cfr* in plasmidi di *Staphylococcus* spp. (A) ed *Enterococcus* spp. (B). Tratto da Shen *et al.*

1.3.4 Il gene *cfr*(B)

Durante uno studio condotto su ceppi di *Clostridium difficile*, venne identificata una variante del gene *cfr* [41]; l'analisi di sequenza di questo gene *cfr*-like ha evidenziato notevoli differenze rispetto al gene *cfr* di *S. sciuri* e la sequenza amminoacidica aveva un'identità

del 75% con la proteina Cfr rilevata negli stafilococchi ed enterococchi. Ciò suggeriva l'esistenza di un nuovo gene di resistenza [42]. Successivamente questo nuovo gene venne identificato anche in due isolati clinici di *E. faecalis* che mostravano elevati valori di MIC di linezolid, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina. I due isolati erano positivi per il gene *cfr* e presentavano la mutazione G2576T su un allele dell'rRNA 23S; non erano, invece, presenti mutazioni nelle proteine L3 e L4. Inoltre la sequenza nucleotidica di questi geni mostrava identità del 74.9% con il *cfr* di *S. sciuri* e un'identità del 99.7% con i geni *cfr*-like riscontrati nei ceppi di *C. difficile*. Esperimenti di clonaggio dimostrarono che c'era correlazione tra la presenza dei geni *cfr*-like e la comparsa di resistenza al linezolid; il nuovo gene venne così denominato *cfr*(B) [43]. Lo stesso studio evidenziò che anche la proteina Cfr(B) apparteneva alla superfamiglia delle SAM, in quanto il gene *cfr*(B) condivideva lo stesso dominio conservato con *cfr* (nonostante un'identità nucleotidica piuttosto bassa). Il gene *cfr*(B) è solitamente localizzato sul trasposone non coniugativo Tn6218, integrato a livello cromosomico (Figura 11), ma in uno studio

successivo è stata rilevata una sua variante anche a livello plasmidico in ceppi clinici di *E. faecium* isolati in Germania [44]. Il trasposone Tn6218, appartenendo alla famiglia dei trasposoni non coniugativi, manca di un meccanismo di coniugazione funzionale; per tale motivo sono necessari ulteriori studi per comprendere il meccanismo di diffusione di *cfr*(B).



Figura 11. Rappresentazione schematica del contesto genetico di *cfr*(B). Tratto da Deshpande *et al.*

1.3.5 Il gene *cfr*(C)

La scoperta di *cfr*(C) risale al 2017, durante degli studi di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza su ceppi di *Campylobacter* nel bestiame da allevamento negli Stati Uniti [45]. In particolare, un isolato di *Campylobacter coli* di origine bovina mostrava elevati valori di MIC di florfenicolo e cloramfenicolo, oltre a resistenza a varie classi di antibiotici. Esperimenti di trasferibilità genica evidenziarono la presenza di un plasmide coniugativo di 48 kb (pTx40) contenente 47 ORF (*Open Reading Frame*), di cui 22

codificavano per proteine a funzione nota. Tra le proteine ipotetiche invece, attirò l'interesse un gene di 1.140 bp codificante una proteina di 379 aa che aveva elevata similarità con le proteine della famiglia SAM, ma con identità del 55.1% e 54.9% rispettivamente con *cfr* di *S. sciuri* e *cfr(B)* di *E. faecium*. Venne quindi ipotizzato che questo gene, denominato *cfr(C)*, codificasse per una nuova proteina, Cfr(C), in grado di conferire multiresistenza. Questa ipotesi fu confermata attraverso esperimenti di clonaggio, che evidenziarono anche il coinvolgimento del gene *cfr(C)* nella comparsa del fenotipo PhLOPS_A in *Campylobacter*.

Un ulteriore studio effettuato su clostridi con fenotipo PhLOPS_A, dimostrò la presenza di un gene *cfr*-like, che venne poi identificato come *cfr(C)*; il gene era tuttavia localizzato su un trasposone di 24 kb denominato Tn6314 [46]. La proteina Cfr(C) possedeva una similarità del 50% con la sequenza di Cfr di *S. sciuri*. Anche in questo caso quindi *cfr(C)* si è mostrato responsabile del fenotipo di resistenza PhLOPS_A.

1.3.6 Il gene *cfr*(D)

Il gene *cfr*(D) è stato identificato per la prima volta in Francia, nell'isolato clinico *E. faecium* 15-307.1 [47]. Questo ceppo, che presentava elevati valori di MIC di linezolid e tedizolid (rispettivamente di 4 e 16 mg/L), era positivo per il gene *optrA*. Analisi di Whole Genome Sequencing (WGS) evidenziarono anche la presenza di un gene di 1.074 pb, localizzato su un plasmide coniugativo, che codificava per una proteina di 357 amminoacidi appartenente alla famiglia delle proteine Cfr [48]. La nuova proteina conteneva il motivo conservato caratteristico degli enzimi SAM, ma presentava solo il 64% di identità amminoacidica con Cfr e Cfr(B), e il 48% con Cfr(C). Il nuovo gene *cfr*-like è stato quindi denominato *cfr*(D). Analisi del contesto genetico di *cfr*(D), hanno rilevato la presenza di alcune *IS1216* in prossimità del gene, ma il loro ruolo nella possibile mobilizzazione di *cfr*(D) non è ancora stato chiarito.

Esperimenti di coniugazione evidenziarono che *optrA* e *cfr*(D) erano trasferiti con bassa frequenza agli enterococchi, ed i transconiuganti esprimevano con successo entrambi i geni. Inoltre, per studiare il coinvolgimento di *cfr*(D) nella resistenza al

linezolid, questo gene è stato clonato nel vettore pAT29 e fatto esprimere in diverse specie batteriche. In *Enterococcus* spp., l'introduzione del plasmide ricombinante non determinava resistenza, mentre in *E. coli cfr(D)* si è dimostrato responsabile del fenotipo PhLOPS_A; questo fenomeno non è stato ancora chiaramente interpretato.

Il gene *cfr(D)* è stato isolato, insieme ad *optrA*, anche in un ceppo clinico di *E. faecium* in Australia [49], ma il contesto genetico non è stato descritto e, in generale, ancora si hanno poche informazioni su questo gene *cfr*-like.

1.3.7 Il gene *cfr(E)*

Anche *cfr(E)* è stato descritto solo recentemente. Il suo primo isolamento è avvenuto nel 2019, in un ceppo clinico di *C. difficile* durante uno studio sui geni *cfr* in America Latina [50]. In particolare, il ceppo *C. difficile* DF11 presentava un gene codificante per un enzima appartenente alla famiglia SAM, il cui prodotto aveva identità amminoacidica solo del 51-58% con le sequenze di Cfr, Cfr(B), Cfr(C), e Cfr(D). Questo gene, denominato

cfr(E), era localizzato su un elemento genetico mobile non ben caratterizzato che mostrava omologie con sequenze genomiche di diversi *Firmicutes* intestinali.

Per comprendere il funzionamento della metilasi, *cfr*(E) è stato clonato nel vettore pET28b e sovraespresso in *E. coli*. L'enzima prodotto è stato quindi purificato e utilizzato per saggi di metilazione dell'rRNA 23S di *E. coli in vitro*, da cui è emersa la capacità di metilazione di Cfr(E) (seppur con bassa attività). Inoltre, l'analisi dell'rRNA metilato, ha rivelato che l'enzima Cfr(E) metilava il C8 del nucleotide A2503. Ad oggi, non sono stati segnalati altri isolamenti del gene *cfr*(E).

1.3.8 Il gene *optrA*

Il gene *optrA* (Oxazolidinone Phenicol Transferable Resistance) è stato identificato per la prima volta nel 2015 in Cina in un isolato clinico di *E. faecalis* (E349) resistente agli oxazolidinoni, ma che non presentava mutazioni ribosomiali e il gene *cfr* [51]. Esperimenti di coniugazione dimostrarono che la resistenza poteva essere trasferita e, tramite S1-PFGE, venne rivelata la presenza di

un plasmide di 36 kb denominato pE349 (Figura 12). Il sequenziamento di pE394 rivelò la presenza di 39 ORF di cui 18 codificavano per proteine a funzione nota e 21 per proteine ipotetiche. L'analisi di sequenza indicò la presenza di un gene di 1.968 bp codificante per una proteina di 655 aa, che presentava un'identità del 99.4% con le proteine della famiglia delle ABC-transporter protein, responsabili della resistenza a fenicoli e oxazolidinoni. Inoltre, la proteina Optra era filogeneticamente correlata a Vga(A), Vga(C), Vga(E) e Lsa(E) che conferiscono resistenza a lincosamidi, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A. In pE349 erano presenti anche i geni *fexA* (responsabile della resistenza ai fenicoli), *repB* e *repC* (coinvolti nella replicazione plasmidica) e *mobA*, *prgI*, *traE*, *tnp* e *traG* (associati a eventi di coniugazione).

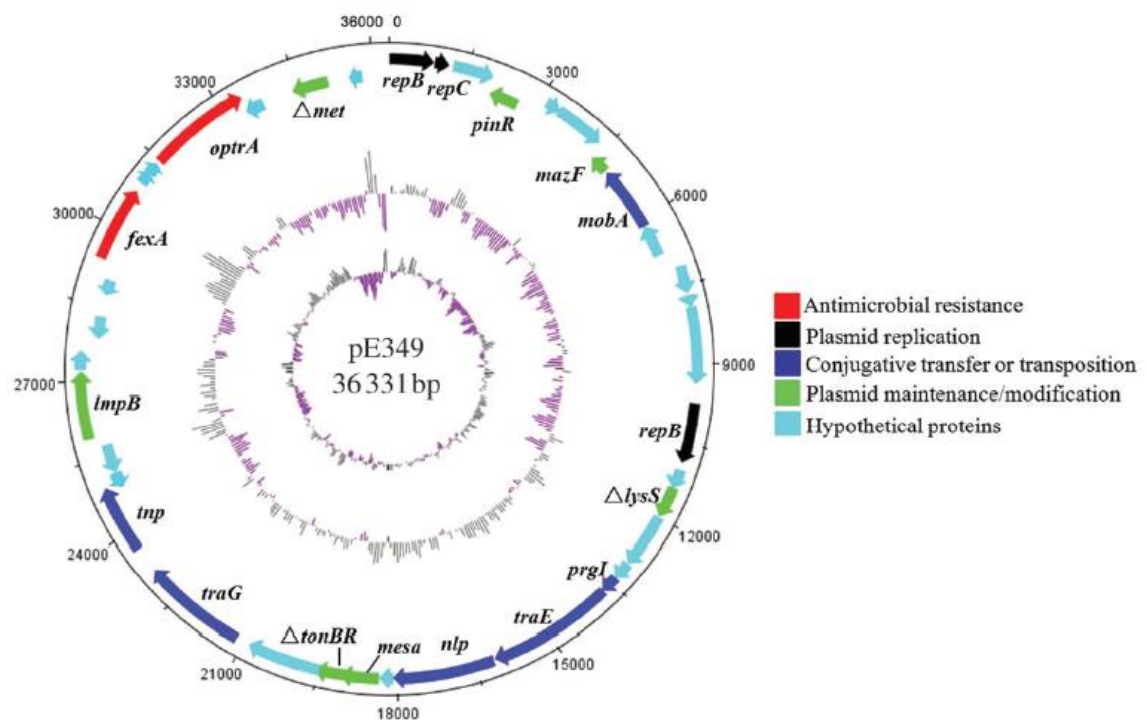


Figura 12. Rappresentazione schematica del plasmide pE349 di *E. faecalis* E349. Tratto da Wang *et al.*

Le proteine ABC-transporter accoppiano l'energia dell'idrolisi dell'ATP ad una varietà di fenomeni biologici essenziali, che includono il trasporto transmembrana, la riparazione del DNA e la regolazione dell'espressione genica [52]. La proteina Optra appartiene alle proteine ABC-F, che presentano due domini associati all'ATPasi ma in cui manca il dominio transmembrana.

Inizialmente venne ipotizzato che *optra* codificasse per un sistema di efflusso attivo, ma successivi studi dimostrarono che la proteina

Optra, come le proteine ABC-F, agisce legandosi alla subunità 50S a livello del sito A, proteggendo il ribosoma dal legame con gli oxazolidinoni e i fenicoli [53]. Un recente studio ha evidenziato come proteine della famiglia ABC-F conferiscono resistenza agli inibitori dell'allungamento della traduzione, che intrappolano il tRNA nel sito P del ribosoma (Figura 13) [54].

Dopo la scoperta di *optra*, enterococchi positivi per questo gene, sia di origine clinica che animale, vennero identificati in tutto il mondo. Nel 2016, *optra* è stato identificato per la prima volta in Italia, in due isolati clinici di *E. faecium* che possedevano anche un gene *cfr* silente [55]. Inoltre, confrontando la variante italiana (*optra*_{E35048}) con quelle finora descritte, è emerso che *optra*_{E35048} differisce maggiormente dal wild-type E349 (20 sostituzioni amminoacidiche) rispetto alle varianti cinesi, che mostrano un limitato numero di sostituzioni [56].

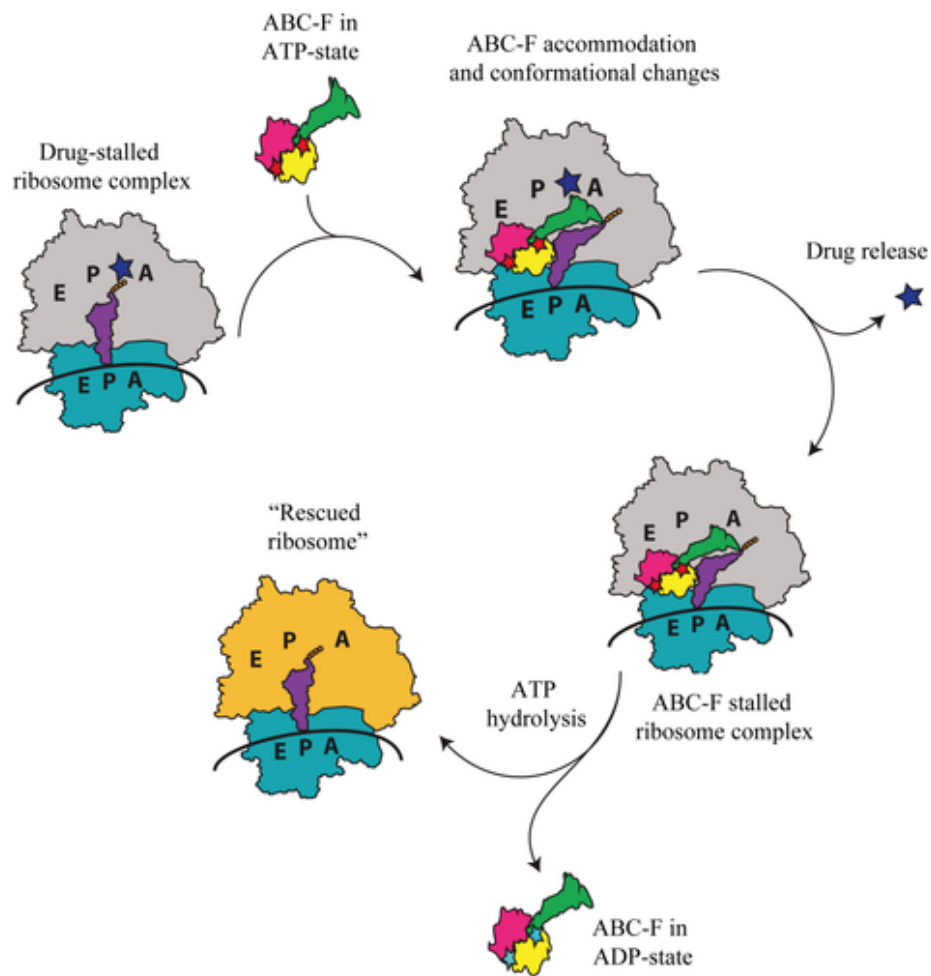


Figura 13. Rappresentazione schematica del meccanismo di protezione ribosomiale delle proteine ABC-F. La stella blu indica il sito PTC/NPET, target dell'antibiotico. Le stelle rossa e celeste indicano, rispettivamente, il legame della proteina ABC-F con ATP e ADP. Tratto da Ero *et al.*

Solitamente *optrA* è localizzato a livello plasmidico e fiancheggiato da sequenze di inserzione, come *IS1216*, che svolgono un ruolo importante nella diffusione del gene di resistenza tra i diversi tipi di plasmidi degli enterococchi [57]. Nello studio di He *et al.* venne

anche analizzato il contesto genetico del gene *optrA* localizzato a livello cromosomico, che era molto diverso da quello presente nei plasmidi. Infatti, la stretta associazione di *optrA* ai trasposoni Tn558 e Tn554 fece ipotizzare un loro coinvolgimento nel meccanismo di integrazione cromosomica, in quanto in grado di escidere e, attraverso la formazione di un intermedio circolare, integrarsi in una nuova sequenza target. Nel 2019 venne identificato in un ceppo di *E. faecalis* di origine suina, un nuovo trasposone cromosomico della famiglia Tn554 chiamato Tn6674, che possedeva anche altri geni di resistenza come *spc*, *erm(A)*, e *fexA* [58]. Negli anni *optrA* è stato identificato anche in stafilococchi, streptococchi e, nel 2020, per la prima volta anche nei Gram-negativi [59].

1.3.9 Co-localizzazione plasmidica di *cfr* e *optrA*

Uno studio più approfondito sul ceppo di *E. faecium* E35048, isolato in Italia e positivo per *cfr* e *optrA* [55], ha consentito di localizzare questi due geni sul plasmide pE35048-oc (41.816 pb) ad una distanza di 23.1 kb [60]. Questo plasmide portava anche diversi

geni di resistenza quali: *erm*(B) (macrolidi), *msr*(C) (macrolidi e streptogramine di gruppo B), *tet*(M) (tetraciclina), *aphA* e *aadE* (aminoglicosidi) e *sat4* (streptotricina). pE35048-oc mostrava un'identità nucleotidica del 96% con il plasmide pRE25. Il contesto *optrA* era localizzato a valle del gene *erm*(B), sul trasposone Tn662 integrato nel gene codificante per la Zeta Toxin Protein. A valle di *optrA* era presente *ISEfa15*, appartenente alla famiglia delle IS21 e codificante per una trasposasi ed una proteina helper che promuovono l'escissione in forma circolare delle sequenze; una copia troncata di *ISEfa15* è stata riscontrata anche a monte del gene *optrA*. Il gene *cfr* era inserito nel gene *lnu*(E) ed era fiancheggiato da due *ISEnfa5*. Entrambi i contesti genetici erano in grado di escindersi.

Una co-localizzazione di *optrA* e *cfr* è stata riportata anche in un altro plasmide (pF12-0805) di 72.9 kb, isolato in un ceppo clinico di *E. faecium* che condivideva elevata similarità con il plasmide pRE25 [61]. Le strutture di pE35048-oc e pF12-0805 sono messe a confronto in Figura 14. L'analisi dei contesti genetici dei geni di resistenza al linezolid nei due plasmidi non ha rilevato differenze tra gli ambienti genetici di *cfr*. Per quanto riguarda *optrA*, invece,

in pEF12-0805 il gene è associato alla porzione di Tn554 che porta *erm(A)* e non è fiancheggiato da sequenze di inserzione che ne consentano l'escissione.

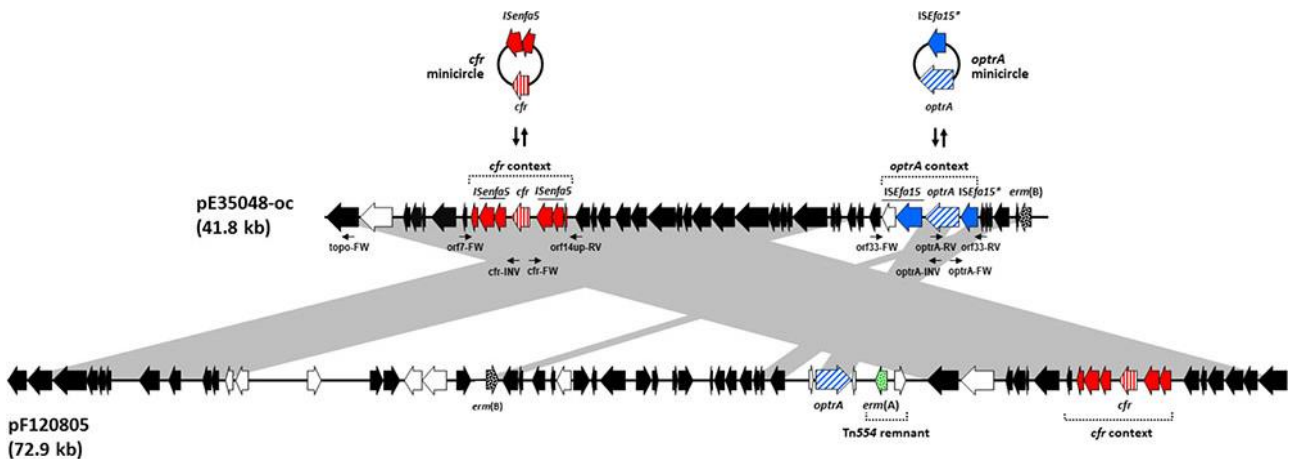


Figura 14. Confronto dei contesti genetici di *cfr* ed *oprA* in pE35048-oc di *E. faecium* E35048 e in pF120805 di *E. faecium* F120805. Tratto da Morroni *et al.*

1.3.10 Il gene *poxA*

poxA (Phenicol, OXazolidinones and Tetracyclines) è stato identificato per la prima volta nel 2018, in un MRSA linezolid-resistente (AOUC-0915) proveniente da un paziente ospedalizzato affetto da fibrosi cistica e sottoposto a trattamento con il linezolid [62]. L'analisi del genoma mediante WGS aveva rilevato la presenza di una ORF codificante per una proteina di 542 aa con una

similarità di circa il 32% con OptrA. Il gene *poxA* era in associazione con i geni *fexB*, *erm(B)* e *cfr* e codificava per una proteina appartenente alla famiglia ABC-F note per proteggere il bersaglio ribosomiale dal legame con gli antibiotici. *poxA* è responsabile di una ridotta sensibilità a fenicoli (florfenicolo e cloramfenicolo), oxazolidinoni (linezolid e tedizolid) e tetracicline (tetraciclina e doxiciclina). Il gene era compreso tra due elementi IS1216-like con lo stesso orientamento, suggerendo una possibile mobilizzazione genica; ipotesi supportata anche dalla distribuzione in specie diverse Gram-positive (*E. faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus acidilactici*). In particolare, *P. acidilactici* possiede la IS1216 a monte del gene *poxA* e con orientamento opposto rispetto a quanto osservato nell'MRSA AOUC-0915, mentre in *E. faecium* è presente una sola copia di IS1216 a valle del gene (Figura 15). Questi isolati erano tutti di origine animale, come la maggior parte dei ceppi *poxA*-positivi descritti finora [63-64]. Ciò ha indotto a pensare che la selezione del gene fosse avvenuta nel serbatoio animale, come si è verificato anche per i geni di resistenza ai fenicoli ed altri antibiotici ampiamente utilizzati in medicina veterinaria. Esperimenti di clonaggio sono stati effettuati

utilizzando ceppi sensibili di *E. coli*, *S. aureus* ed *E. faecalis*, per valutare la capacità di *poxA* di conferire resistenza al linezolid; il risultato era che l'espressione del gene in questi ceppi, riduceva la sensibilità ai fenicoli, agli oxazolidinoni e alle tetracicline. Inoltre, quando espresso in *E. coli*, *poxA* portava una diminuzione della sensibilità agli oxazolidinoni più marcata rispetto a quanto avveniva nei cocchi Gram-positivi.

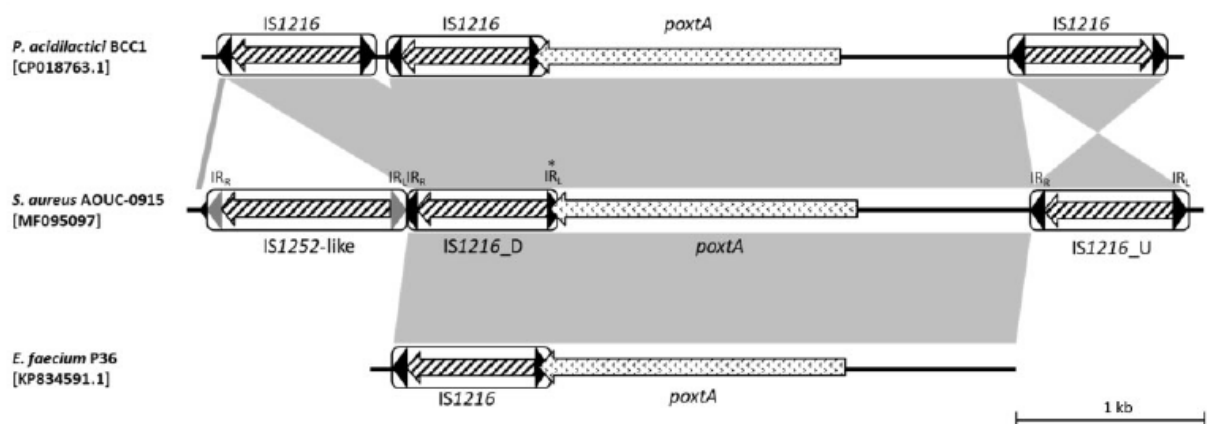


Figura 15. Confronto dei contesti genetici di *poxA* in *P. acidilactici* BBC1, in *E. faecium* P36 e in *S. aureus* AOUC-0915. Le aree grigie indicano le regioni con identità nucleotidica > 99%. Tratto da Antonelli *et al.*

Uno studio più approfondito rivelò che *poxtA* si trovava sul trasposone Tn6349, localizzato a livello cromosomico e integrato all'interno del profago ϕ N315-like (54 kb) interrompendo la sequenza del gene codificante una ATPasi (Figura 16) [65]. Il trasposone è delimitato da due sequenze di inserzione identiche, indicate come IS1216L_{Tn6349} e IS1216R_{Tn6349} disposte con lo stesso orientamento. Inoltre Tn6349 è fiancheggiato da una piccola sequenza ripetuta di 8 bp (5'-AAACAAAT-3'), coinvolta nel meccanismo di duplicazione e trasposizione.

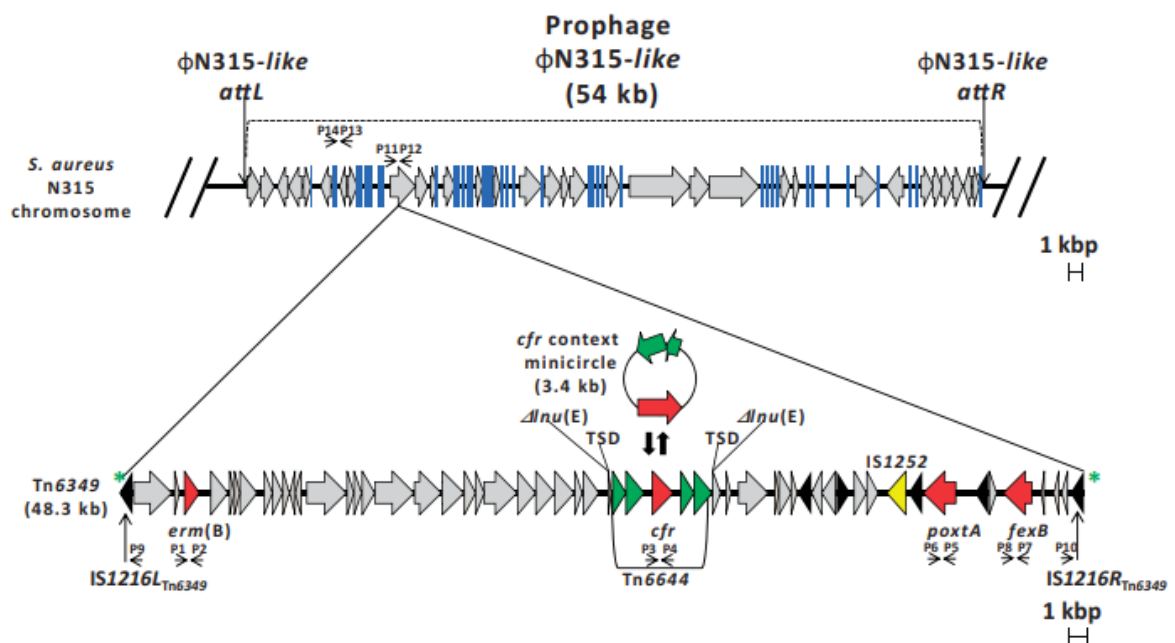


Figura 16. Rappresentazione schematica di Tn6349 con i geni di resistenza *cfr*, *poxtA*, *fexB* e *erm(B)*, integrato nel profago ϕ N315-like. Tratto da D'Andrea *et al.*

Nel trasposone sono localizzati anche i geni di resistenza *cfr*, *erm(B)* e *fexB* responsabili rispettivamente del fenotipo di resistenza PhLOPS_A, MLS_B (Macrolidi, Lincosamidi e Streptogramine B) e della resistenza ai fenicoli. Nello studio di D'Andrea *et al*, è stato ipotizzato che la struttura a mosaico di Tn6349 risulti dalla ricombinazione tra Tn6657, che porta *poxA* e *fexB*, con un plasmide pE35048-oc-like che veicola *erm(B)* e *cfr*, e successiva integrazione nel profago ϕ N315-like.

Dopo la sua scoperta, *poxA* è stato riscontrato anche in un isolato clinico di *E. faecium* in Grecia [66] e, sempre in Italia, in un ceppo di *E. faecium* di origine bovina [67]. Ad oggi, la presenza del gene *poxA* è stata segnalata in enterococchi di origine animale anche in Tunisia e in Spagna [68] [69].

2. MATERIALI E METODI

2.1 Isolamento del ceppo di *A. viridans* *optrA*-positivo

Il ceppo di *A. viridans* è stato isolato da un campione fecale bovino, raccolto nell'ambito del progetto "Rumina". Il progetto, coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", sede di Teramo (IZS di Teramo), era focalizzato sullo studio della diffusione delle antibiotico-resistenze in ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da feci ovine e bovine.

Il campionamento era effettuato in allevamenti da ingrasso dislocati nelle regioni Abruzzo e Molise, che di norma acquistano animali da società agricole locali o di regioni limitrofe, ma in alcuni casi anche da aziende produttrici estere. Negli allevamenti da ingrasso viene portato a termine il ciclo di accrescimento degli animali fino all'età della macellazione con conseguente lavorazione e distribuzione nel settore alimentare o vendita dei capi ad aziende terze.

Il campionamento è stato effettuato prevalentemente da animali in fase post-svezzamento in quanto questa risulta essere generalmente

più soggetta a somministrazione di antibiotici. In ciascun allevamento, in punti diversi dello stabilimento, erano prelevati un numero variabile (da 1 a 5) di pool fecali in relazione all'estensione dell'allevamento.

Nel corso del progetto "Rumina", parallelamente alla ricerca di campylobatteri, nei pool fecali venivano ricercati anche enterococchi florfenicolo-resistenti per monitorare la diffusione di geni di resistenza al linezolid in ambito animale. Ciascun campione fecale era inoculato in 5 ml di acqua peptonata contenente florfenicolo (10 mg/L) ed incubato a 37°C per 24 ore. In seguito, 10 µl erano seminati su Slanetz-Bartley agar addizionato con florfenicolo (10 mg/L) e incubati a 37 °C per 24-48 h. In caso di crescita su terreno selettivo veniva ricercata la presenza di geni di resistenza al linezolid mediante PCR. Gli isolati con determinanti di resistenza al linezolid erano identificati a livello di specie mediante MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux). Un presunto enterococco *optrA*-positivo (1417-4A) era identificato come *A. viridans*. Finora non era mai stata segnalata la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in questo genere batterico.

2.2 Test di Sensibilità

La sensibilità di *A. viridans* 1417-4A a florfenicolo e linezolid, e agli antibiotici comunemente utilizzati nel trattamento delle infezioni sostenute da *Aerococcus* spp. (penicillina, ampicillina, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, vancomicina, rifampicina ed eritromicina), era valutata mediante microdiluizione in brodo.

Le polveri antibiotiche erano risospese nei rispettivi solventi fino alla concentrazione finale di 10 g/L e successivamente conservate ad una temperatura di -20°C.

Per quanto riguarda il tedizolid, non disponendo della polvere, la MIC è stata determinata eseguendo un E-test mediante strip fornite dalla Liofilchem (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia).

I valori di MIC sono stati interpretati in accordo con i breakpoint pubblicati dall'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Tabella 2). Come ceppo di riferimento è stato utilizzato *S. pneumoniae* ATCC 49619.

	Breakpoints <i>A. sanguinicola</i> e <i>A. urinae</i> (mg/L)	
	S	R
Linezolid	N.D	N.D
Tedizolid	N.D	N.D
Florfenicolo	N.D	N.D
Penicillina	$\leq 0,125$	$> 0,125$
Ampicillina	$\leq 0,25$	$> 0,25$
Meropenem	$\leq 0,25$	$> 0,25$
Ciprofloxacina	≤ 2	> 2
Levofloxacina	≤ 2	> 2
Vancomicina	≤ 1	> 1
Rifampicina	$\leq 0,125$	$> 0,125$
Eritromicina	N.D	N.D

Tabella 2. *Breakpoints* suggeriti da EUCAST relativi agli antibiotici saggiati. I breakpoint al florfenicolo non sono disponibili in quanto questo antibiotico è ad esclusivo uso veterinario. N.D non disponibile.

Gli inoculi per i test di microdiluzione in brodo erano ottenuti risospendendo i batteri in Mueller-Hinton II brodo (Oxoid, Basingstoke, UK) fino a raggiungere una densità ottica di 0,5 McFarland, approssimativamente corrispondente a una concentrazione batterica di 1×10^8 CFU/ml. La sospensione

batterica, dopo essere stata diluita 1:100 in Mueller-Hinton II brodo (1×10^6 CFU/ml), era inoculata nei pozzetti di una piastra microtiter, in cui precedentemente erano state inserite concentrazioni scalari degli antibiotici da saggiare. Le piastre erano incubate a 37°C per 18h.

2.3 Estrazione DNA totale

L'estrazione del DNA totale era effettuata utilizzando il kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma-Aldrich Co, Milano, Italia). Il ceppo batterico era inoculato in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid) e incubato a 37°C overnight. La brodocoltura ottenuta era centrifugata a 13.000 g per 2 minuti; eliminata la fase liquida il pellet era risospeso in 200 µl di *Lysozyme Solution* (Sigma) contenente 45 mg/ml di lisozima, e successivamente incubato per 3h a 37°C. Terminata l'incubazione, erano aggiunti prima 20 µl di RNAsiA, lasciando in incubazione per 2 minuti a temperatura ambiente, poi 200 µl di *Lysis Solution* (Sigma) e 20 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) per ottenere la lisi cellulare e la digestione proteica. Seguiva un'incubazione a 55°C per 10 minuti per rendere efficace la digestione. Successivamente erano aggiunti

200 µl di etanolo assoluto mescolato invertendo il campione più volte. La soluzione era trasferita all'interno delle colonnine fornite dal kit e precedentemente attivate. Dopo centrifugazione a 6.500 g per 1 minuto erano effettuati due lavaggi con 500 µl di *Wash Solution*. A questo punto, dopo aver trasferito le colonnine in nuove eppendorf, erano aggiunti 200 µl di *Elution Solution* per il recupero del DNA. Il DNA estratto dopo centrifugazione a 6.000 g per 1 minuto, era conservato a -20°C.

2.4 Saggi di amplificazione

Per la ricerca del gene *optrA* nei transconiuganti sono stati effettuate reazioni di PCR con la coppia di primer riportata in Tabella 3.

Geni	Primer^a	Sequenza (5'-3')	Dimensione amplicon (bp)
<i>optrA</i>	optrA FW	GCTGATAGATAAAAATGGAGAAT	1.035
	optrA RV	TGAGCAAGCTGTTGGTCAAAT	

Tabella 3. Primer utilizzati per la ricerca del gene *optrA*.

^a Questa coppia di primer è stata utilizzata per ottenere l'amplicone che, dopo essere stato marcato (vedi dopo), è stato impiegato come sonda negli esperimenti di ibridazione

Gli amplificati erano ottenuti mediante la *DreamTaq polymerase* (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Inoltre, per determinare la capacità di escissione del contesto genetico di *optrA*, sono stati allestiti esperimenti di PCR mapping utilizzando la coppia di primer esterna al gene riportata in Tabella 4.

Primer	Sequenza (5'-3')
AV-UP	5'-TTGGGAATACTCTAAAACATCTA
AV-DOWN	5'-AAACGGCGGTTACGGTCTTG

Tabella 4. Primer utilizzati nei saggi di PCR inversa.

L'amplificazione era ottenuta utilizzando la *ExTaq polymerase* (TaKaRa Bio, Shiga, Japan).

I entrambi i casi i prodotti di PCR erano separati su gel di agarosio all'1% contenente *GreenGel 1X* (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia). Il gel, immerso in Tris Acetato EDTA (*TAE buffer*), era sottoposto a una corrente di 80V. Come marker erano utilizzati GeneRuler 100pb DNA Ladder e GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.5 Saggi di trasferibilità

Per valutare la trasferibilità del gene di resistenza *optrA*, il ceppo di *A. viridans* 1417-4A era utilizzato come donatore in esperimenti di coniugazione su filtro. Come ricevente è stato impiegato *E. faecium* 64/3 (Werner 97), ceppo sensibile a florfenicolo e linezolid ma resistente a rifampicina e acido fusidico. La selezione dei transconiuganti era ottenuta su piastre contenenti florfenicolo (10 mg/L), rifampicina (25 mg/L) ed acido fusidico (25 mg/L).

Donatore e ricevente erano inoculati in BHI brodo fino al raggiungimento di una densità ottica OD₆₇₅ di 0,4 e poi filtrati attraverso filtri di nitrocellulosa con pori di 0,45 µm (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Successivamente il filtro era rimosso sterilmente, posizionato su una piastra di BHI agar, ed incubato a 37 °C per 24 ore. I batteri cresciuti alla superficie erano rimossi immergendo il filtro in una provetta contenente 10 ml di soluzione fisiologica sterile. La provetta era, quindi, vortexata per alcuni secondi. Rimosso il filtro, la sospensione batterica era centrifugata per 10 minuti a 8.000 rpm; il pellet ottenuto era risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica sterile.

Si procedeva, quindi, con una serie di diluizioni scalari fino a 10^{-15} . Per la conta delle CFU/ml ricevente, piastre selettive di BHI contenenti acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L)] erano state inoculate con 10 μ l di ciascuna diluizione. Per la selezione dei transconiuganti, 100 μ l della sospensione batterica (dall'intero fino alla diluizione 10^{-5}) erano spatolati su piastre di BHI contenenti florfenicolo (10 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Dopo un'incubazione di 24-48 h a 37 °C, si procedeva con la conta delle colonie per determinare la frequenza di trasferimento, espressa come numero di CFU/ml di transconiugante per ricevente.

I transconiuganti ottenuti erano saggiati mediante PCR per la presenza di *optrA* e per la loro sensibilità a florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tedizolid.

2.6 S1-PFGE

Un'analisi preliminare del plasmidoma batterico di donatore, ricevente e transconiuganti è stata effettuata mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dopo aver sottoposto il DNA totale a restrizione con la nucleasi S1, enzima specifico per tratti di DNA a

singolo filamento. Nel DNA plasmidico, le tensioni causate dal superavvolgimento possono transitoriamente originare regioni a singolo filamento. La nucleasi S1 taglia un filamento e, successivamente, anche l'altro, rimasto non appaiato in conseguenza del primo taglio. Il plasmide, che risulta quindi linearizzato, migra in PFGE in base alle sue dimensioni. La S1 nucleasi, in realtà, taglia anche regioni superavvolte del DNA genomico, ma ciò ha luogo con frequenza molto bassa e senza produrre frammenti in grado originare bande definite [70].

Un ml di brodocoltura overnight (ad una concentrazione di DNA pari a 10 µg/ml) era centrifugato, lavato con 0,5 ml di *TEN Buffer* (Tris EDTA NaCl), ed infine risospeso in 0,5 ml di *TEN Buffer* cui veniva aggiunto un volume equivalente di *low-melting agarose* (Bio-Rad, Hercule, USA) all'1,6%. Per preservare il DNA cromosomico dalla frammentazione spontanea, questa soluzione veniva fatta solidificare in appositi stampi (plug-mold). I blocchetti di agarosio (plug) erano quindi sottoposti ad estrazione del DNA e restrizione. Brevemente, le plug erano incubate a 37°C per 24 h in una soluzione di lisi contenente lisozima (1mg/ml) e RNasi A (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich Co, Milano, Italia). Al termine

dell'incubazione, ad ogni plug erano aggiunti 3 ml di *Digestion Buffer* contenente Proteinasi K (0,5 µg/ml). Seguiva una incubazione a 50°C per 24h. A questo punto le plug erano sottoposte a 3 lavaggi con 10 ml di *TE Buffer* (Tris EDTA).

Il DNA era digerito ponendo metà plug in una soluzione contenente 30 U di enzima S1 (ThermoFisher Scientific) e incubando per 25 min; per bloccare la digestione era aggiunto 1 ml di EDTA 0,5 M. Successivamente le plug erano posizionate in appositi pettini per elettroforesi ed incluse nel gel *Pulsed Field Certified Agarose* (Bio-Rad) all'1%. La corsa elettroforetica era effettuata in tampone TBE (Tris Borato EDTA) mediante l'apparecchiatura Chef Mapper XA System (Bio-Rad), i cui elettrodi sono disposti ad esagono in modo da generare un campo elettrico con angolo di 120° in tutte le parti del gel.

La corsa elettroforetica aveva durata complessiva di 22 h con le seguenti condizioni: campo elettrico 6V/cm, switch iniziale 1 secondo, switch finale 20 secondi e ramping factor lineare. Come peso molecolare era usato *Mid-Range PFG Markers* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Il gel era colorato con bromuro di etidio (0,5 µg/ml) e visualizzato al transilluminatore.

2.7 Southern blotting e ibridazione

Esperimenti di Southern blotting ed ibridazione con la sonda specifica per *optrA*, sono stati effettuati per determinare la localizzazione genica. Dopo S1-PFGE il DNA era trasferito su membrana di nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) mediante trasferimento capillare. Il gel era prima sottoposto a depurinazione e denaturazione, e poi messo a contatto con la membrana in un apposito contenitore con un tampone, per permettere il trasferimento di DNA. Il contatto con la membrana è stato favorito ponendo sopra una pila di fogli di carta assorbente.

Successivamente il DNA era fissato alla membrana attraverso irradiazione con UV. Seguiva una pre-ibridazione in tampone *Ultra-hyb* (Ultrasensitive Hybridization Buffer) a 50 °C per 2h. A questo punto si procedeva con l'ibridazione mediante aggiunta della sonda specifica per il gene *optrA* marcata con biotina e precedentemente denaturata a 100°C per 10 minuti. Per favorire il processo di ibridazione, membrana e sonda erano incubate overnight e in leggera agitazione.

La sonda *oprA*, ottenuta dal prodotto di PCR, è stata marcata con biotina tramite il kit *Psoralen-Biotin BrightStar* (ThermoFisher Scientific). Terminata l'incubazione, la sonda in eccesso è stata rimossa tramite una serie di lavaggi a forza ionica decrescente tramite SCC Buffer (saline-sodio citrato) e SDS (Sodio-dodecil-solfato). La rilevazione della sonda marcata è stata effettuata secondo le indicazioni del kit di marcatura, che sfrutta l'elevata affinità di legame della streptavidina per la biotina con produzione di un segnale luminoso che è stato impresso su lastra fotografica. La reazione di ibridazione consente di valutare la localizzazione, plasmidica e/o cromosomica, del determinante di resistenza.

2.8 Sequenziamento

Per caratterizzare l'elemento genetico che veicola *oprA*, il genoma di *A. viridans* 1417-4A è stato sottoposto ad analisi WGS (Whole Genome Sequencing) mediante *Next Generation Sequencing* impiegando la tecnologia *Illumina MiSeq* (MicrobesNG, Birmingham, UK) con reads 2x250pb. L'assemblaggio *de novo* delle reads è stato effettuato attraverso il software *SPAdes*

(<http://bioinf.spbau.ru/spades>) [71]. L'identificazione *in silico* dei geni acquisiti di antibiotico-resistenza è stata effettuata utilizzando strumenti resi disponibili dal “Center for Genomic Epidemiology” <http://www.genomicepidemiology.org/> (MLST v.2.0, ResFinder v.3.2, LRE-finder v.1.0) e mediante i software BLAST, ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

3. RISULTATI

3.1 Test di sensibilità

Il fenotipo di resistenza di *A. viridans* 1417-4A è stato caratterizzato mediante determinazione della MIC di linezolid, tedizolid, florfenicolo, penicillina, ampicillina, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, vancomicina, rifampicina ed eritromicina. I valori di MIC sono riportati in Tabella 5.

Antibiotici	MIC (mg/L)
Linezolid	1
Tedizolid	1
Florfenicolo	16
Penicillina	2
Ampicillina	0,5
Meropenem	4
Ciprofloxacina	2
Levofloxacina	4

Vancomicina	0,5
Rifampicina	0,125
Eritromicina	>16

Tabella 5. Profilo di sensibilità di *A. viridans* 1417-4A.

I breakpoints relativi a linezolid e tedizolid non sono forniti dall'EUCAST (Tabella 2), in quanto questi antibiotici non vengono impiegati nel trattamento di infezioni umane da aerococco.

A. viridans 1417-4A si è dimostrato resistente a penicillina, ampicillina, meropenem e levofloxacin.

3.2 Trasferibilità del gene *optrA*

La capacità del gene *optrA* di essere trasferito da *A. viridans* 1417-4A ad *E. faecium* 64/3 ricevente è stata valutata mediante esperimenti di coniugazione su filtro. *A. viridans* 1417-4A era in grado di trasferire il determinante di linezolid-resistenza *optrA* a *E. faecium* 64/3 con una frequenza di trasferimento di $1,7 \times 10^{-5}$ UFC per ricevente. Per confermare l'acquisizione del gene di resistenza, due transconiuganti scelti a caso erano caratterizzati per il loro

profilo di sensibilità e per la presenza del determinante di resistenza *optrA* mediante PCR (Tabella 6).

Ceppi	MIC (mg/L)										
	LZD ^a	TZD	FFC	PEN	AMP	MER	CIP	LEV	VAN	RIF	ERY
<i>A. viridans</i> 1417-4A (donatore)	1	1	16	2	0.5	4	2	4	0.5	0.125	>16
<i>E. faecium</i> (transconiugante 1)	4	1	16	0.125	0.125	0.125	0.25	1	0.5	>128	8
<i>E. faecium</i> (transconiugante 2)	4	1	16	0.125	0.125	0.125	0.25	1	0.5	>128	8
<i>E. faecium</i> 64/3 (ricevente)	1	1	4	0.125	0.125	0.125	0.25	1	0.5	>128	1

Tabella 6. Valori MIC di *A. viridans* 1417-4A, di due transconiuganti e di *E. faecium* 64/3.

^aAbbreviazioni: LZD, linezolid; TZD, tedizolid; FFC, florfenicolo; PEN, penicillina; AMP, ampicillina; MER, meropenem; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; VAN, vancomicina; RIF, rifampicina; e ERY, eritromicina.

Entrambi i transconiuganti avevano valori di MIC di tedizolid e florfenicolo uguali a quelli del donatore (rispettivamente 1 e 16 mg/L). La MIC di linezolid dei transconiuganti mostrava, invece, un incremento di quattro volte (4 mg/L) rispetto a quella di *A. viridans* 1417-4A (1 mg/L).

3.3 Localizzazione genica

Gli esperimenti di S1-PFGE, Southern blot e ibridazione hanno permesso di chiarire la localizzazione del gene di resistenza *optrA* in *A. viridans* 1417-4A. La sonda specifica per *optrA* ibridizzava su un plasmide di circa 34 kb denominato pAv-*optrA*. Il plasmide era rilevabile anche nei due transconiuganti ottenuti negli esperimenti di trasferimento genico.

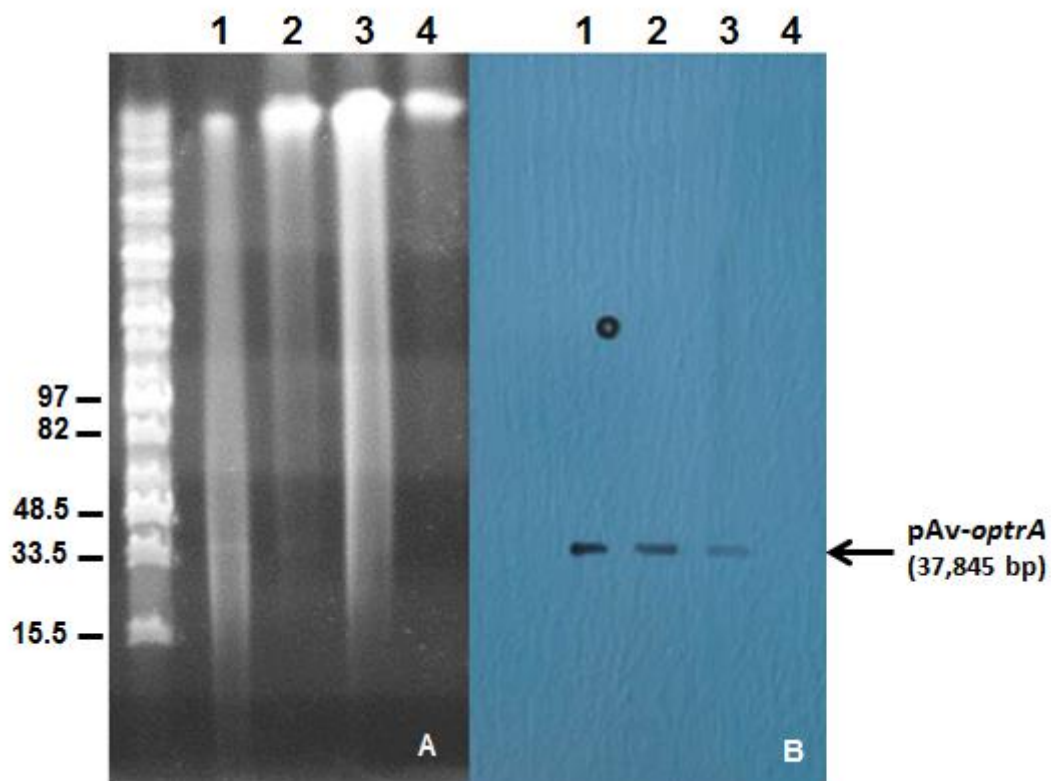


Figura 17. (A) S1-PFGE: **1** *A. viridans* 1417-4 (donatore); **2** *E. faecium* TC-1 (transconiugante 1); **3** *E. faecium* TC-2 (transconiugante 2); **4** *E. faecium* 64/3 (ricevente). Nella prima colonna (non numerata) il marker Mid-range PFG. (B) Ibridazione con la sonda *optrA*: la freccia indica il plasmide pAv-*optrA*.

3.4 Caratterizzazione del plasmide pAv-*optrA*

Lo studio dei dati risultanti dal WGS di *A. viridans* 1417-4A ha rivelato che il gene *optrA* era localizzato su un nuovo plasmide di 37.845 bp chiamato pAv-*optrA*. Il plasmide ha un contenuto di G+C

del 32% e mostra 35 ORF le cui caratteristiche sono indicate in dettaglio in Tabella 7.

L'organizzazione del plasmide pAv-*optrA*, la cui sequenza è stata depositata in GenBank con numero di accesso MW364930, è schematizzata in Figura 18.

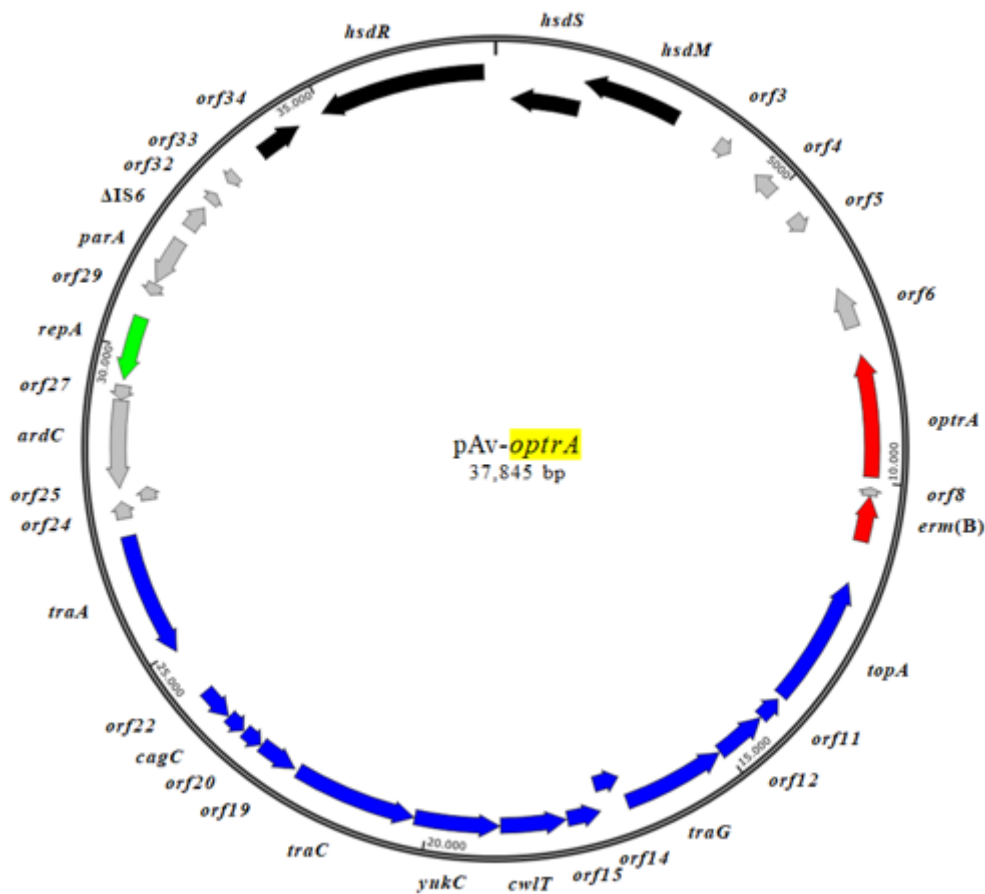


Figura 18. Rappresentazione schematica del plasmide pAv-*optrA* (numero accesso MW364930). Le ORF sono indicate dalle frecce, orientate nella direzione di trascrizione.

Sono indicati: in rosso i geni di antibiotico-resistenza; in verde il gene *rep*; in nero il sistema di restrizione/metilazione; in blu il sistema di coniugazione; in grigio tutte le altre ORF.

Analisi BLASTP ^a

ORF	Inizio (bp)	Fine (bp)	Lunghezza (AA)	Funzione	Match più significativi nel database	N° accesso	% identità AA (% similarità AA)
<i>orf1</i>	1,449	283	388	Subunità S endonucleasi di restrizione	Subunità S endonucleasi di restrizione [<i>Aerococcus viridans</i>]	WP_111856479.1	65 (72)
<i>orf2</i>	3,038	1,449	528	Subunità della DNA metilasi del sistema di restrizione/metilazione di tipo 1	Subunità M del sistema di restrizione/metilazione tipo 1 [<i>A. viridans</i>]	WP_111856478.1	98 (99)
<i>orf3</i>	3,797	4,039	80	DNA-invertasi hin	DNA-invertasi hin [<i>A. viridans</i>]	SPT61043.1	100 (100)
<i>orf4</i>	4,979	4,581	132		Proteina ipotetica [<i>Escherichia coli</i>]	WP_160516845.1	93 (95)
<i>orf5</i>	5,489	5,761	90		Proteina ipotetica [<i>Aerococcus urinaeequi</i>]	HCT97980.1	43 (61)
<i>orf6</i>	7,486	6,833	217		Proteina contenente il dominio DUF262 [<i>Enterococcus faecalis</i>]	HAP3453445.1	100 (100)
<i>orf7</i>	9,915	7,948	655	Proteina di protezione ribosomiale tipo ABC-F, OptrA	Proteina di protezione ribosomiale tipo ABC-F OptrA [<i>E. faecalis</i>]	HAP3438646.1	99 (99)
<i>orf8</i>	10,213	10,082	43		Proteina ipotetica [Bacteria]	WP_000085855.1	100 (100)
<i>orf9</i>	10,955	10,218	245	Adenina metilasi RNA ribosomiale	rRNA 23S (adenina(2058)-N(6))-metiltransferasi Erm(B) [Firmicutes]	WP_001038790.1	100 (100)
<i>orf10</i>	13,753	11,648	701	DNA topoisomerasi IA	DNA topoisomerasi tipo IA [<i>Enterococcus</i>]	WP_104846964.1	75 (85)
<i>orf11</i>	14,223	13,831	130		Proteina ipotetica [<i>Tetragenococcus solitarius</i>]	WP_068710574.1	43 (64)
<i>orf12</i>	15,082	14,237	281		Prodotto proteico senza nome	WP_192982111.1	51 (72)
<i>orf13</i>	16,770	15,097	557	Proteina del Sistema di secrezione di tipo IV coinvolta nel trasferimento del DNA coniugativo	Proteina della famiglia di trasferimento del DNA coniugativo del sistema di secrezione tipo IV [<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>]	WP_138472019.1	86 (92)
<i>orf14</i>	17,207	16,770	145		Proteina ipotetica [<i>Alkalibacterium gilvum</i>]	WP_091636415.1	54 (73)
<i>orf15</i>	17,764	17,222	180		Proteina di trasferimento coniugativo [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPC]	WP_157850759.1	46 (63)
<i>orf16</i>	18,835	17,783	350	Dominio N-terminale del lisozima simile a CwIT	Proteina della famiglia del lisozima [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPC]	WP_053083829.1	62 (77)
<i>orf17</i>	20,214	18,850	454	Sistema di secrezione proteica	Proteina ipotetica [<i>Enterococcus faecium</i>]	EGP5098947.1	43 (68)
<i>orf18</i>	22,223	20,229	664	Proteina TraC del sistema di secrezione tipo IV	Proteina contenente il dominio DUF87 [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPC]	WP_053083830.1	77 (87)

<i>orf19</i>	22,941	22,291	216		Proteina di trasferimento coniugativo [<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>]	WP_138472028.	64 (81)
<i>orf20</i>	23,289	22,957	110		Proteina ipotetica [<i>M. psychrotolerans</i>]	WP_138472031.1	54 (77)
<i>orf21</i>	23,634	23,314	106	Isola di patogenicità cag, sistema di secrezione tipo IV	Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729905.1	63 (78)
<i>orf22</i>	24,188	23,646	180		Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729908.1	40 (66)
<i>orf23</i>	26,975	24,972	667	Proteina della famiglia MobA/MobL	Proteina della famiglia MobA/MobL [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_053083831.1	52 (68)
<i>orf24</i>	27,266	27,532	88		Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729913.1	42 (71)
<i>orf25</i>	27,507	27,728	73		Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729916.1	62 (80)
<i>orf26</i>	29,159	27,756	467	Proteina antirestrizione ArdC	Famiglia delle metallo-endopeptidasi ImmA/IrrE [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729918.1	76 (83)
<i>orf27</i>	29,398	29,165	77		Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729921.1	97 (97)
<i>orf28</i>	30,526	29,492	344	Proteina di inizio replicazione A (RepA)	Proteina di inizio replicazione A [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729642.1	76 (85)
<i>orf29</i>	31,097	30,912	61		Proteina ipotetica [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729641.1	92 (96)
<i>orf30</i>	31,901	31,128	257	Proteina di ripartizione plasmidica	Proteina della famiglia ParA [<i>Carnobacterium</i> sp. 1290_CSPEC]	WP_048729640.1	89 (93)
<i>orf31</i>	32,141	32,548	135	Trasposasi DDE	Famiglia delle trasposasi IS6, parziale [<i>E. faecium</i>]	WP_147239629.1	94 (95)
<i>orf32</i>	32,677	32,847	56		Proteina ipotetica [Bacilli]	WP_164507104.1	100 (100)
<i>orf33</i>	33,279	33,106	57		Proteina ipotetica FOB80_07155 [<i>A. viridans</i>]	QGS37267.1	100 (100)
<i>orf34</i>	33,808	34,545	245	Dominio metiltransferasi	Metiltransferasi SAM-dipendenti Classe I [<i>Carnobacterium</i> sp. PL12RED10]	WP_149358818.1	99 (100)
<i>orf35</i>	37,663	34,976	895	Superfamiglia delle elicasi DEAD-like	Proteina R dell'enzima di restrizione tipo 1 [<i>A. viridans</i>]	SPT61052.1	99 (99)

Tabella 7. Identità/similarità delle sequenze aminoacidiche delle proteine codificate dal plasmide pAv-*optrA*.

^a Per ogni ORF è riportata l'identità più significativa.

L'analisi bioinformatica mediante BLAST evidenzia che il plasmide pAv-*optrA* è formato essenzialmente da quattro regioni principali:

(i) Regione di antibiotico-resistenza.

In questa regione sono presenti il gene *optrA* (responsabile della resistenza a fenicoli e oxazolidinoni) e il gene *erm(B)* (responsabile della resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramine di gruppo B). L'analisi di sequenza indica che il gene *optrA* rilevato in *A. viridans* 1417-4A ha un'identità del 98% con il gene *optrA* di pE394 di *E. faecalis* E394 (numero accesso KP399637.1). Per quanto riguarda il confronto delle sequenze amminoacidiche, la proteina OptrA mostra 22 sostituzioni rispetto al wild type OptrA_{E394} (96% identità, 98% similarità) (Figura 19).

Il contesto genetico di *optrA* rilevato in *A. viridans* 1417-4 non mostrava somiglianza significativa con altri contesti descritti in precedenza in altre specie batteriche.

(ii) Regione di coniugazione. Si estende dalla *orf10* alla *orf23*. Comprende il gene *topA* (codifica per la DNA topoisomerasi IA) e tutti i geni che codificano per il sistema di secrezione di tipo IV

(*traG*, *traC*, *traA* e *cagC*), garantendo la riuscita del processo coniugativo tra cellula donatrice e ricevente.

(iii) **Regione di replicazione e ripartizione.** In questa regione si trovano i geni *repA* (*orf28*) e *parA* (*orf30*) che codificano rispettivamente per una proteina coinvolta nella regolazione del numero di copie del plasmide e per la proteina che assicura la corretta distribuzione del plasmide alle cellule figlie.

(iv) **Cassetta completa di restrizione/metilazione di tipo 1.** Questa regione comprende la *orf35*, *orf1* e *orf2* che codificano rispettivamente per la subunità di taglio, riconoscimento e metilazione del sistema di restrizione/metilazione. Ha un'identità del 96% con la corrispondente regione dei plasmidi ad ampio spettro d'ospite, pC25-1 (numero accesso MH784601) e pC27-2 (numero accesso MH784602) di *E. faecium* CC17.

Av	1	LSEATFAIASTYVKEDMKMQYKIINGAVYYDGNMVLNIGIEINDNEKIAIVGRNGCGKT	60
		+S+ATFAIAST KEDMKMQYKIINGAVYYDGNMVLNIGIEINDNEKIAIVGRNGCGKT	
Ef	1	MSKATFAIASTNAKEDMKMQYKIINGAVYYDGNMVLNIGIEINDNEKIAIVGRNGCGKT	60
Query	61	TLLKAIIGEIELEEGTGESEFQVIKTGNPYISYLRQMPFEDESISMVDEVRTVFKTLIDM	120
		TLLKAIIGEIELEEGTGESEFQVIKTGNPYISYLRQMPFEDESISMVDEVRTVFKTLIDM	
Sbjct	61	TLLKAIIGEIELEEGTGESEFQVIKTGNPYISYLRQMPFEDESISMVDEVRTVFKTLIDM	120
Query	121	EKKMKQLIDKMENQCDDKIINEYSDI LERYMALGGLTYQKEYETMIRSMGFTEAD DKKPI	180
		E KMKQLIDKMENQ DDKIINEYSDI ERYMALGGLTYQKEYETMIRSMGFTEAD KKPI	
Sbjct	121	ENKMKQLIDKMENQYDDKIINEYSDI SERYMALGGLTYQKEYETMIRSMGFTEADYKKPI	180
Query	181	SEFSGGQRTKIAFIKILLTKPDILLLDEPTNHLDIETIQWLESYLRSYKSTLVIISHDRM	240
		SEFSGGQRTKIAFIKILLTKPDILLLDEPTNHLDIETIQWLESYLRSYKSTLVIISHDRM	
Sbjct	181	SEFSGGQRTKIAFIKILLTKPDILLLDEPTNHLDIETIQWLESYLRSYKSTLVIISHDRM	240
Query	241	FLNRIVDKVYEIEWGETKCYKGNYSAFEEQKRENHIKQQKDYDLQQIEIERITRLIERFR	300
		FLNRIVDKVYEIEWGETKCYKGNYSAFEEQKRENHIKQQKDYDLQQIEIERITRLIERFR	
Sbjct	241	FLNRIVDKVYEIEWGETKCYKGNYSAFEEQKRENHIKQQKDYDLQQIEIERITRLIERFR	300
Query	301	YKPTKAKMVQSKIKLLQRMQILNAPDQYDTKTYMSKFQPRISSSRQVLS VSELVIGYDTP	360
		YKPTKAKMVQSKIKLLQRMQILNAPDQYDTKTYMSKFQPRISSSRQVLS SELVIGYDTP	
Sbjct	301	YKPTKAKMVQSKIKLLQRMQILNAPDQYDTKTYMSKFQPRISSSRQVLS ASELVIGYDTP	360
Query	361	LAKVNFNLERGQKLGIVGSDGIGKSTLLKTLMDGASALSGDFKFGYNVEISYFDQQLAQI	420
		LAKVNFNLERGQKLGIVGSDGIGKSTLLKTLM G +ALSGDFKFGYNVEISYFDQQLAQI	
Sbjct	361	LAKVNFNLERGQKLGIVGSDGIGKSTLLKTLMDGVAALSGDFKFGYNVEISYFDQQLAQI	420
Query	421	SGDDTLFEIFQSEYPELNDTEVRTALGSFQFSGDDVFRPVSSLSGGEKVRVLTCLKLLYKR	480
		SGDDTLFEIFQSEYPELNDTEVRTALGSFQFSGDDVFRPVSSLSGGEKVRVLTCLKLLYKR	
Sbjct	421	SGDDTLFEIFQSEYPELNDTEVRTALGSFQFSGDDVFRPVSSLSGGEKVRVLTCLKLLYKR	480
Query	481	TNVLILDEPTNHMDIIGKENLENILCSYKGTIIFVSHDRYFTNKIADRLLVFDKDGVEFV	540
		TNVLILDEPTNHMDIIGKENLENILCSY+GTIIFVSHDRYFTNKIADRLLVFDKDGVEFV	
Sbjct	481	TNVLILDEPTNHMDIIGKENLENILCSYQGTIIFVSHDRYFTNKIADRLLVFDKDGVEFV	540
Query	541	ESTYGEYEKKRLNSEKPFNYINVEKKVEKNNTVKGDRNSIEKEKVKKEKRIEKLEVLINQ	600
		+STYGEYEKKR+NSEKPFN I VE+KVEKNNTVKGDRNSIEKEKVKKEKRIEKLEVLINQ	
Sbjct	541	QSTYGEYEKKRMNSEKPFNNIKVEQKVEKNNTVKGDRNSIEKEKVKKEKRIEKLEVLINQ	600
Query	601	YDEELERLNKIIISQPNNSDYIVLTELQKSIDEVKRCQGIYFNEWEQLMGELEVM	655
		YDEELERLNKIIIS+PNNSDYIVLTE+QKSID+VKRCQG YFNEWEQLM ELEV	
Sbjct	601	YDEELERLNKIIISEPNNSDYIVLTEIQKSIDDVKRCQGN YFNEWEQLMRELEV	655

Figura 19. Allineamento della sequenza amminoacidica della proteina Optra di *A. viridans* 1417-4A (Av) ed *E. faecalis* E349 (Ef).

Gli amminoacidi non corrispondenti sono evidenziati in grigio.

3.6 Capacità del contesto genetico di *optrA* in *pAv-optrA* di escindere in forma circolare

Analisi di sequenza del plasmide *pAv-optrA* hanno escluso la presenza di sequenze di inserzione fiancheggianti il contesto genetico di *optrA*. Da uno studio della sequenza del plasmide più approfondito, sono state trovate due *direct repeats* (DRs) imperfette fiancheggianti il contesto genetico di *optrA*, e strutture circularizzabili non convenzionali (UCS). Tali strutture possono essere escisse in forma circolare grazie alle DRs fiancheggianti la sequenza di DNA sottoposta a escissione. Tuttavia, esperimenti di PCR inversa, hanno mostrato che il contesto genetico di *optrA* non è in grado di escindere in forma circolare.

4. DISCUSSIONE

La resistenza batterica agli antibiotici è oggi uno dei principali problemi di salute pubblica a livello globale. Il fenomeno coinvolge ormai gran parte delle specie batteriche con conseguente drastica riduzione dell'efficacia degli antibiotici disponibili nel trattamento delle infezioni. Questo problema è particolarmente grave in ambito nosocomiale dove insorgono infezioni spesso difficilmente trattabili con i farmaci di cui disponiamo. Il rapporto "Review on Antimicrobial Resistance" redatto da Lord O'Neill stima che nel 2050 le infezioni batteriche causeranno circa 10 milioni di morti all'anno con una previsione di costi che supera i 100 trilioni di dollari. Occorre considerare, inoltre, che i pazienti ospedalizzati hanno una maggiore probabilità di ricevere una terapia antibiotica e che nel 50% dei casi l'impiego di questi farmaci è inappropriato; quest'ultimo aspetto è ritenuto la causa principale dello sviluppo di antibiotico-resistenze. L'OMS e i governi di tutto il mondo, al fine di sensibilizzare la popolazione sulla minaccia rappresentata dall'antibiotico-resistenza, hanno adottato delle strategie che

includono: la formazione continua, politiche e linee guida basate sull'evidenza, misure restrittive e consulenze da parte di infettivologi, microbiologi e farmacisti. Considerando anche il rallentamento nello sviluppo di nuove molecole antimicrobiche, è essenziale preservare i farmaci attualmente disponibili facendone un uso corretto.

Gli oxazolidinoni, farmaci ad esclusivo uso umano, sono considerati antibiotici di “ultima risorsa” in quanto in grado di trattare gravi infezioni sostenute da batteri MDR. La resistenza a questi antibiotici rappresenta quindi una grave minaccia tra i patogeni Gram-positivi. Il linezolid, capostipite della famiglia degli oxazolidinoni, è molto efficace nel trattamento di gravi infezioni sostenute da MRSA, VRE, e pneumococchi, enterococchi e micobatteri MDR. Fin da subito, è stato ampiamente utilizzato grazie alle sue eccellenti caratteristiche farmacocinetiche, alla sua biodisponibilità, oltre alla sua facile somministrazione e la bassa incidenza di effetti collaterali. Nel 2014, la FDA approva per uso clinico anche il tedizolid che mostra una maggiore efficacia nei confronti di patogeni MDR, inclusi quelli resistenti al linezolid.

Nel 2008 il fatturato mondiale derivante dalla vendita di Zyvox® superò il miliardo di dollari [20]; il linezolid era, infatti, impiegato anche in trattamenti prolungati, poiché la natura sintetica di questo farmaco indusse a ritenere che lo sviluppo di resistenze sarebbe stato poco probabile. Le prime resistenze al linezolid furono, in realtà, segnalate poco dopo la sua introduzione sul mercato [28], ma all'inizio il fenomeno si manifestò sporadicamente e sempre associato a mutazioni nell'rRNA 23S o nelle proteine ribosomiali L3 e L4. Solo in un secondo momento sono comparsi geni di resistenza trasferibili (*cfr*, varianti *cfr*-like, *optrA* e *poxA*), non solo in ceppi clinici, ma anche di origine animale; ciò rappresenta un grave pericolo per la loro capacità di diffondere nella popolazione batterica. Questi determinanti di resistenza sono principalmente localizzati su elementi genetici mobili, che spesso conferiscono resistenza anche ad altri antibiotici come fenicoli e tetracicline (*poxA*), farmaci ampiamente impiegati in ambito veterinario per prevenire o trattare infezioni batteriche. La pressione selettiva esercitata da questi farmaci ha favorito la diffusione della resistenza al linezolid anche nei ceppi di origine animale che, a loro volta, possono trasferirla ai patogeni umani

attraverso la catena alimentare. Infatti, la preoccupante situazione emersa nei ceppi umani rappresenta solo una parte di un fenomeno molto più esteso in ambito animale e ambientale.

Nel 2015 è stato identificato per la prima volta il gene *optrA*, codificante un meccanismo di protezione ribosomiale [53] che conferisce resistenza a oxazolidinoni e fenicoli. Dopo la sua scoperta in Cina, la presenza di questo gene è stata riscontrata inizialmente in enterococchi sia di origine clinica che animale, fino ad emergere anche negli stafilococchi, streptococchi e nei batteri Gram-negativi.

Gli enterococchi sono microrganismi che appartengono al normale microbiota del tratto gastrointestinale umano e di molti animali. Per questo motivo, sono rilasciati in grandi quantità nell'ambiente con le feci e possono essere isolati dal suolo, dall'acqua, dai vegetali e da alimenti di origine animale, tanto che vengono utilizzati come indicatori fecali della qualità delle acque e degli alimenti. Considerati innocui commensali nei soggetti sani gli enterococchi, in presenza di condizioni predisponenti, possono causare gravi quadri clinici come endocarditi, sepsi e infezioni del tratto urinario. Al genere *Enterococcus* appartengono oltre 50 specie, *E. faecalis*

ed *E. faecium* sono considerate tra i più importanti patogeni ospedalieri. I membri di questo genere batterico sono in grado di sopravvivere in condizioni ambientali difficili come l'ambiente nosocomiale [72]. Negli enterococchi l'antibiotico-resistenza è principalmente associata all'acquisizione di geni localizzati su elementi genetici mobili (per lo più plasmidi coniugativi) che consentono a questi microrganismi di resistere e adattarsi ai diversi ambienti [73].

Gli oxazolidinoni sono tra i pochi antibiotici ancora disponibili per il trattamento di infezioni sostenute da VRE ed enterococchi MDR, pertanto, la diffusione della resistenza a linezolid e tedizolid in questi microrganismi viene attentamente monitorata, sia in ambito clinico che animale, attraverso la ricerca dei geni *cfr* e *cfr*-like, *optrA* e *poxxA*. Un'attenta analisi della circolazione dei ceppi linezolid-resistenti è essenziale per individuare la presenza di reservoir animali e per valutare il potenziale pericolo per l'uomo.

Nel corso di una sorveglianza, in collaborazione con l'IZS di Teramo, su enterococchi di origine animale è stato isolato un ceppo bovino (1417-4A) positivo per il gene *optrA*. L'isolato, tuttavia, sottoposto a identificazione con MALDI-TOF, risultava

appartenere alla specie *A. viridans*. Questa è la prima segnalazione della presenza di geni di resistenza al linezolid negli aerococchi. In *A. viridans* 1417-4A, *optrA* è localizzato sul plasmide pAv-*optrA* di circa 38 kb che risulta trasferibile *in vitro* a *E. faecium* 64/3. I transconiuganti enterococcici avevano una MIC di linezolid quattro volte superiore rispetto al ricevente: *optrA* di *A. viridans* sembra pertanto in grado di conferire una ridotta sensibilità al linezolid negli enterococchi.

A. viridans è risultato resistente anche ad altri importanti antibiotici: penicillina, ampicillina, meropenem e levofloxacin.

L'analisi di sequenza del contesto genetico di *optrA* in pAv-*optrA* indica che il gene è fiancheggiato da *direct repeats* imperfette e quindi incapaci di permettere l'escissione di *optrA* in forma circolare, come confermato da saggi di PCR inversa.

Si può ipotizzare che il mantenimento di pAv-*optrA* in *A. viridans* 1417-4A sia garantito da meccanismi di killing post-segregazionale dovuti alla presenza di un sistema di restrizione/metilazione (RM) plasmidico. Questo sistema, che costituisce un meccanismo di difesa per le cellule batteriche contro virus e altro materiale

genetico estraneo, in realtà si comporta come elemento genetico “selfish” [74]. Infatti, alcuni sistemi RM vengono difficilmente persi dalla cellula batterica attuando diverse strategie per il loro mantenimento all’interno di una popolazione batterica. In particolare, la loro perdita porterebbe alla morte della cellula batterica per lo squilibrio che si crea tra enzimi di restrizione e metilasi, con conseguente frammentazione del DNA.

La presenza del gene *optrA* in una specie microbica in cui non erano mai stati segnalati determinanti di resistenza al linezolid è motivo di grave preoccupazione.

Gli aerococchi sono cocchi Gram-positivi facilmente confusi, fino all’avvento della tecnologia MALDI-TOF, con streptococchi alfa-emolitici, stafilococchi ed enterococchi. Descritti per la prima volta nel 1953, nei trentacinque anni successivi sono stati pubblicati solo pochissimi studi riguardanti infezioni nell’uomo. Oggi, tuttavia, gli i membri di questo genere batterico sono riconosciuti patogeni umani emergenti, responsabili di infezioni urinarie e di gravi forme invasive. In considerazione di ciò, la presenza di geni di resistenza al linezolid in *A. viridans* crea preoccupazione così come la

capacità di questo aerococco di trasferire pAv-*optrA* ad enterococchi riceventi.

Nonostante il florfenicolo non sia mai stato approvato per uso clinico nell'uomo, è molto utilizzato per prevenire o curare infezioni enteriche e respiratorie degli animali. Il florfenicolo, attraverso meccanismi di co-selezione può promuovere la diffusione non solo dei geni di resistenza ai fenicoli, ma anche dei geni di resistenza al linezolid. Va inoltre sottolineato che i fenicoli, dopo essere stati eliminati dagli animali trattati, rimangono attivi nel suolo e sono in grado di esercitare una pressione selettiva anche sui batteri ambientali [75]. Attraverso questo meccanismo *optrA* potrebbe essere stato trasferito agli aerococchi, genere batterico cui appartengono specie molto diffuse nell'ambiente, ma anche isolate da alimenti di origine animale e vegetale e recentemente riconosciute patogeni umani emergenti.

Questo studio sottolinea ancora una volta l'importanza di studiare i reservoir animali e il loro resistoma. È ormai chiaro che solo un approccio "One Health", che considera la salute degli esseri umani degli animali e dell'ambiente strettamente legata, consentirà di

preservare l'efficacia dei farmaci, in particolar modo di quelli “last resort” come gli oxazolidinoni.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. J Gen Microbiol 1953; 8: 475-80.
doi: 10.1099/00221287-8-3-475
2. Janosek J, Eckert J, Hudàc A. *Aerococcus viridans* as a causative agent of infectious endocarditis. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1980; 24:92-6.
3. Untereker WJ, Hanna BA. Endocarditis and osteomyelitis caused by *Aerococcus viridans*. Mt Sinai J Med 1976; 43:248-52.
4. Taylor PW, Trueblood MC. Septic arthritis due to *Aerococcus viridans*. J Rheumatol 1985; 12:1004-5.
5. Colman G. *Aerococcus*-like organisms isolated from human infections. J Clin Pathol 1967; 20:294-7. doi: 10.1136/jcp.20.3.294
6. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. J Gen Microbiol 1992; 138:401–5. doi: 10.1099/00221287-138-2-401
7. Shannon O, Mörgelin M, Rasmussen M. Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis causing pathogen. Infect Immun 2010; 78:4268-75.
doi: 10.1128/IAI.00469-10

8. Rasmussen M. Aerococci and aerococcal infections. *J Infect* 2013; 66:467-474. doi: 10.1016/j.jinf.2012.12.006
9. Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect* 2015; 22:22-27. doi: 10.1016/j.jinf.2012.12.006
10. Cattoir V, Kobal A, Legrand P. *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:775-80. doi: 10.3109/00365548.2010.485576
11. Senneby E, Nilson B, Petersson AC, Rasmussen M (2013). Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry is a sensitive and specific method for identification of aerococci. *J Clin Microbiol* 51:1303-1304. doi: 10.1128/JCM.02637-12
12. Senneby E, Göransson L, Weiber S, Rasmussen M. A population-based study of aerococcal bacteraemia in the MALDI-TOF MS-era. *J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35:755-762. doi: 10.1007/s10096-016-2594-z
13. Ballester JM, Ballester M, Belaich JP. Purification of the viridicin produced by *Aerococcus viridans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:784-8. doi: 10.1128/AAC.17.5.784
14. Swanson H, Cutts E, Lepow M. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia in a child receiving prophylaxis for

sickle-cell disease. Clin Infect Dis 1996; 22:387–8. doi:10.1093/clinidi/22.2.387

15. Ezechukwu I, Singal M, Igbinsosa O. *Aerococcus viridans*: case report, microbiology, and literature review. Am J Case Rep, 2019; 20:697-700. doi: 10.12659/AJCR.914866

16. Balvinder M, Kamran Z, Naveen A, Neelam T. *Aerococcus viridans*: a rare pathogen causing urinary tract infection. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2017; 11: DR01-DR03. doi: 10.7860/JCDR/2017/23997.9229

17. Moreno L, Matajiraa C, Gomes V. Molecular and antibiotic susceptibility characterization of *Aerococcus viridans* isolated from porcine urinary infection. Veterinary Microbiology, 2016; 184:7-10. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.01.002

18. Sun M, Gao J, Ali T. Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC, yield, and composition. Tropical Animal Health and Production, 2017; 49:843-849. doi: 10.1007/s11250-017-1271-2

19. Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ et al. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of DuP 105 and DuP 721. Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31:1791-1797. doi:10.1128/aac.31.11.1791

20. Shaw KJ and Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1241:48-70. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06330.x

21. Zhanel GG, Love R, Adam H, et al. Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs*. 2015; 75:253-70. doi: 10.1007/s40265-015-0352-7
22. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018; 12:1759-1767. doi:10.2147/DDDT.S164515.
23. Zhang X, Falagas ME, Vardakas KZ, et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of therapy with linezolid containing regimens in the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *J Thorac Dis*. 2015;7:603–615. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.03.10
24. Flanagan S, Fang E, Munoz KA, et al. Single and multiple-dose pharmacokinetics and absolute bioavailability of tedizolid. *Pharmacother*. 2014; 34:891-900. doi:10.1002/phar.1458
25. Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol. Biol*. 1999; 294:93-101. doi: 10.1006/jmbi.1999.324.
26. Xiong L, Kloss P, Douthwaite S et al. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J Bacteriol*. 2000; 182:5325-5331.

doi: 10.1128/JB.182.19.5325-5331.2000

27. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:603-612. doi: 10.1128/AAC.05702-11

28. Tsiodras S, Gold H, Sakoulas G et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 358:207–08. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05410-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05410-1)

29. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2014; 17:1-12. doi: 10.1016/j.drug.2014.04.002

30. Miller K, Dunsmore CJ, Fishwick CW et al. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1737-1742.
doi: 10.1128/AAC.01015-07

31. Long KS, Munck C, Andersen TM, et al. Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:4705-4713. doi:10.1128/AAC.00644-10

32. Bøsling J, Poulsen SM, Vester B, Long KS. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:2892–2896. doi: 10.1128/AAC.47.9.2892-2896.2003

33. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ et al. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3554-3557.
doi: 10.1128/AAC.49.8.3554-3557.2005
34. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:2530-3. doi:10.1128/AAC.44.9.2530-2533.2000.
35. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 2005; 57:1064-73. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x.
36. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, et al. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2500-2505.
doi:10.1128/AAC.00131-06.
37. Locke JB, Finn J, Hilgers M et al. Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the *cfr* methyltransferase gene or ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:5337-43. doi: 10.1128/AAC.00663-10.

38. Shen J, Wang Y, Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:1697-706. doi:10.1093/jac/dkt092.
39. Wang Y, Li D, Song L, Liu Y et al. First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:4061-4063. doi: 10.1128/AAC.00713-13
40. Liu Y, Wang Y, Wu C, et al. First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:1650-4. doi: 10.1128/AAC.06091-11
41. Marín M, Martín A, Alcalá L, et al. *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:586-9. doi:10.1128/AAC.04082-14
42. Schwarz S, Wang Y. Nomenclature and functionality of the so-called *cfr* gene from *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:2476-7. doi: 10.1128/AAC.04893-14
43. Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, et al. Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr*(B), in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:6256-61. doi: 10.1128/AAC.01473-15

44. Bender JK, Fleige C, Klare I et al. Detection of a *cfr*(B) Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. PLoS One. 2016; 11:e0167042. doi: 10.1371/journal.pone.0167042
45. Tang Y, Dai L, Sahin O et al. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr*(C) in foodborne pathogen *Campylobacter*. J Antimicrob Chemother. 2017; 1581-1588. doi: 10.1093/jac/dkx023
46. Candela T, Marvaud JC, Nguyen TK, Lambert T. A *cfr*-like gene *cfr*(C) conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50:496-500. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.013
47. Sassi M, Guérin F, Zouari A et al. Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006–16. J Antimicrob Chemother. 2019; 74:1469-72. doi:10.1093/jac/dkz097
48. Guérin F, Sassi M, Dejoies L et al. Molecular and functional analysis of the novel *cfr*(D) linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother. 2020; 75(7):1699-1703. doi:10.1093/jac/dkaa125
49. Pang S, Boan P, Lee T et al. Linezolid-resistant ST872 *Enterococcus faecium* harbouring *optrA* and *cfr*(D) oxazolidinone resistance genes. Int J Antimicrob Agents. 2020; 55(1):105831. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.10.012.

50. Stojkovic V, Ulate MF, Hidalgo-Villeda F et al. *cfr*(B), *cfr*(C), and a New *cfr*-Like Gene, *cfr*(E), in *Clostridium difficile* Strains Recovered across Latin America.
51. Wang Y, Lv Y, Cai J et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J Antimicrob Chemother. 2015; 70:2182-90. doi:10.1093/jac/dkv116
52. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. Microbiol Mol Biol Rev. 2008; 72:317-364. doi:10.1128/MMBR.00031-07
53. Sharkey LKR, Edwards AE, O'Neill AJ. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. mBio. 2016; 7:e01975. doi: 10.1128/mBio.01975-15
54. Ero R, Kumar V, Su W, Gao YG. Ribosome protection by ABC-F proteins Molecular mechanism and potential drug design. Protein Science. 2019; 28:684-693. doi: 10.1002/pro.3589.
55. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, et al. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. J Antimicrob Chemother. 2016; 71: 1118-1129. doi: 10.1093/jac/dkv438.
56. Morroni G, Brenciani A, Simoni S. Commentary: Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene *optrA* in

Enterococcus isolates in China from 2004 to 2014. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1631. doi: 10.3389/fmicb.2017.01631.

57. He T, Shen Y, Schwarz S et al. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:1466-73. doi:10.1093/jac/dkw016.

58. Li D, Li XY, Schwarz S et al. Tn 6674 Is a Novel Enterococcal *optrA*-Carrying Multiresistance Transposon of the Tn554 Family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63:e00809-19. doi:10.1128/AAC.00809-19.

59. Liu D, Yang D, Liu X et al. Detection of the enterococcal oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Campylobacter coli*. *Vet Microbiol.* 2020; 246:108731. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108731

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

61. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM et al. Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location

of *cfr* and *optrA* in VRE. J Antimicrob Chemother. 2017; 72:3252-3257. doi:10.1093/jac/dkx292

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

63. Kang ZZ, Lei CW, Kong LH et al. Detection of transferable oxazolidinone resistance determinants in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of swine origin in Sichuan Province, China. Glob Antimicrob Resist. 2019; 19:333-337. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.021

64. Chen L, Hu JX, Liu C. Identification of the Multiresistance Gene *poxxA* in Oxazolidinone-Susceptible *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus saprophyticus* of Pig and Feed Origins. Pathogens. 2021; 10:601. doi: 10.3390/pathogens10050601.

65. D'Andrea MM, Antonelli A, Brenciani A et al. Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying *poxxA*, *cfr* and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. J Antimicrob Chemother. 2019; 74:2870-2875. doi:10.1093/jac/dkz278.

66. Papagiannitsis C, Tsilipounidaki K, Malli E, Petinaki E. Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate

carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxA*. J Antimicrob Chemother. 2019; 74:2461-2462.

doi: 10.1093/jac/dkz155

67. Brenciani A, Fioriti S, Morroni G et al. Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxA*. J Antimicrob Chemother. 2018; 74:817–818. doi: 10.1093/jac/dky505.

68. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS et al. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. J Antimicrob Chemother. 2019; 74:2865-2869. doi: 10.1093/jac/dkz263

69. Ripa LR, Feßler A, Hanke D et al. Detection of *poxA*- and *optrA*-carrying *Enterococcus faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. J Glob Antimicrob Resist. 2019; 22:28-31. doi:10.1016/j.jgar.2019.12.012.

70. Barton, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Biochem. 1995; 226:235-40. doi:10.1006/abio.1995.1220.

71. Bankevich A, Nurk S, Antipov D et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012; 19:455-77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

72. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. Clin Microbiol Rev. 2019; 32:e00058-18. doi: 10.1128/CMR.00058-18

73. Werner G, Coque TM, Franz C, et al. Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303:360-79. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.03.001
74. Kobayashi I. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:3742-56. doi: 10.1093/nar/29.18.3742
75. Subbiah M, Mitchell SM, Ullman JL et al. b-Lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77:7255-7260. doi: 10.1128/AEM.05352-11.

Ringraziamenti

Ecco volgere al termine il mio percorso universitario. La strada da percorrere è stata lunga e piena di ansie; quindi, in queste ultime righe desidero ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo tanto desiderato.

Un ringraziamento particolare va alla mia Relatrice, la Prof.ssa Eleonora Giovanetti, per avermi fatta appassionare sempre più al mondo della microbiologia e per tutta la disponibilità e l'aiuto fornito durante la stesura di questa tesi.

A Simona, Sonia e Marzia per avermi pazientemente affiancato e insegnato a stare in laboratorio, per la passione che mi hanno trasmesso nel loro lavoro e per tutti i consigli ricevuti.

A mio fratello e ai miei genitori, che non solo hanno reso economicamente possibili le mie ambizioni senza farmi alcuna pressione, ma hanno sempre creduto in me e mi hanno spronato ad andare avanti, anche quando la strada verso il traguardo sembrava non avere fine.

Ai miei zii e cugini (problematici e non) per il bellissimo rapporto che abbiamo, che ad ogni raduno crea sempre quell'atmosfera familiare in cui posso essere serena e che ha dato tregua alle mie ansie tra un esame e l'altro.

Al mio fantastico gruppo di amici, per tutti i bei momenti di spensieratezza che mi regalano e che hanno contribuito a rendere più leggero il mio percorso universitario; gli anni passano ma sono sempre una costante e, anche se non lo dimostro quasi mai, voglio loro un gran bene.

Alle mie CDM, Beatrice ed Alessia, con cui ho condiviso i più bei momenti di "vita da fuorisede", dai quali è nata un'amicizia speciale; nonostante le diverse scelte di vita e la distanza, sono sempre state presenti, dandomi la certezza che con loro potrò sempre condividere tutto.

Alle coinquiline che mi hanno accompagnato in questo ultimo anno, per tutte le risate e i momenti di disagio che abbiamo condiviso e che hanno rallegrato ogni giornata.

A Elisa, amica d'infanzia e fedele compagna di tutti i "mai na gioia", che è stata presente fino alla fine dei miei scleri e ha colmato tutte le lacune tecnologiche che si sono presentate durante la stesura di questa tesi.

A Jesmina e tutta la "Meiofauna" con cui ho condiviso questi lunghi anni di università, per tutto l'aiuto nello studio e per tutte le gioie e difficoltà che abbiamo affrontato insieme; anche se le nostre strade si stanno dividendo, spero di non perderli mai di vista.

Infine un grazie speciale va ad Enrico, per avermi fatto ritrovare la tranquillità, per tutta la pazienza con cui mi ha sempre sopportato e supportato, trovando una soluzione ad ogni mia ansia e rendendo migliore ogni giornata; se ho trovato l'ultima spinta per arrivare qui, il merito è soprattutto suo.