



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche

XXXI ciclo

**Caratterizzazione molecolare della resistenza ai chinoloni e al
cloramfenicolo in *Streptococcus agalactiae***

Dottoranda:
Serena Simoni

Tutor:
Dott.ssa Marina Mingoia

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> : caratteristiche generali.....	1
1.2 Manifestazioni cliniche.....	2
1.3 Fattori di virulenza	4
1.4 Terapia e profilassi.....	10
1.5 Distribuzione delle antibiotico-resistenze in <i>S. agalactiae</i>	11
1.6 Macrolidi, meccanismo d'azione e strategie di resistenza.....	12
1.7 Chinoloni, meccanismo d'azione e strategie di resistenza.....	15
1.8 Cloramfenicolo, meccanismo d'azione e strategie di resistenza.....	19
1.9 Elementi genetici mobili e contributo alla diffusione orizzontale dei determinanti di resistenza.....	21
1.10 Distribuzione degli ICE in <i>S. agalactiae</i>	24
 2. MATERIALI E METODI	 27
2.1 Ceppi batterici	27
2.2 Antibiotici.....	28
2.3 Test di sensibilità agli antibiotici: antibiogramma e MIC.....	28

2.4 Estrazione del DNA genomico.....	30
2.5 Saggi di amplificazione.....	31
2.6 Elettroforesi in gel di agarosio.....	36
2.7 Esperimenti di restrizione per l'analisi delle regioni QRDR.....	36
2.8 Purificazione, quantificazione e sequenziamento.....	37
2.9 Tipizzazione.....	39
2.9.1 PFGE.....	39
2.9.2 MLST.....	40
2.9.3 Determinazione del sierotipo capsulare.....	41
2.9.4 Determinazione delle proteine di superficie: <i>Alpha-protein</i>	42
2.10 Southern blotting ed ibridazione.....	43
2.11 Coniugazione.....	44
 3. RISULTATI	 45
3.1 Caratterizzazione dei ceppi di <i>S. agalactiae</i> resistenti ai fluorochinoloni.....	45
3.1.1 Determinazione dei profili di sensibilità.....	45
3.1.2 Determinazione dei determinanti di resistenza.....	49
3.1.3 Tipizzazione dei ceppi di <i>S. agalactiae</i> fluorochinoloni-resistenti.....	51
3.1.3.1 Smal-PFGE.....	51
3.1.3.2 Determinazione molecolare del tipo capsulare.....	53
3.1.3.3 Determinazione delle proteine di superficie: <i>Alpha-protein</i>	54

3.1.4 Analisi delle regioni QRDR delle subunità GyrA (DNA-girasi) e ParC (Topoisomerasi IV).....	56
3.2 Caratterizzazione dei ceppi di <i>S. agalactiae</i> resistenti al cloramfenicolo.....	60
3.2.1 Principali caratteristiche dei ceppi di <i>S. agalactiae</i> cloramfenicolo-resistenti.....	60
3.2.2 Caratterizzazione del modulo IQ.....	63
3.2.3 Caratterizzazione del contesto genetico del modulo IQ.....	64
3.2.4 Esperimenti di trasferibilità ed evidenza di un elemento genetico mobile che trasporta i geni <i>mef(I)</i> , <i>catQ</i> ed <i>erm</i> (TR).....	65
3.2.5 Localizzazione dei determinanti di resistenza.....	66
3.2.6 Caratterizzazione del nuovo ICE mosaico.....	67
4. DISCUSSIONE	70
5. BIBLIOGRAFIA	84

1.INTRODUZIONE

1.1 *Streptococcus agalactiae*: caratteristiche generali

Streptococcus agalactiae o streptococco β -emolitico di gruppo B, appartiene al genere *Streptococcus*, un gruppo di batteri Gram-positivi, di forma sferica od ovoidale con un diametro di 1-1.5 μm , immobili, asporigeni, capsulati, catalasi e ossidasi negativi. Al microscopio appaiono disposti in catenelle, meno frequentemente possono ritrovarsi come elementi singoli o disposti in coppia.

Si tratta di microrganismi aerobi-anaerobi facoltativi, la cui crescita è favorita dall'incubazione in CO_2 al 5% e dall'arricchimento con sangue (5%-7%) del terreno colturale. Sulla base delle caratteristiche del polisaccaride C, anche noto come antigene di Lancefield, gli streptococchi vengono suddivisi in 18 gruppi, indicati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla T, escluse I e J. Il gruppo A e il gruppo B comprendono un'unica specie corrispondente rispettivamente allo *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*, GAS) e allo *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS). Entrambe le specie batteriche sono β -emolitiche, ovvero in grado di lisare completamente i globuli rossi in un terreno come l'agar sangue, con la comparsa di un alone chiaro attorno alle colonie. Il test della bacitracina consente la discriminazione tra le due specie, in quanto *S. agalactiae* è resistente all'antibiotico, mentre *S. pyogenes* è sensibile.

S. agalactiae cresce su agar sangue formando colonie grigio-bianche con un diametro di 3-4 mm. La zona di β -emolisi è in genere meno ampia (Figura 1) rispetto a quella che si osserva in altri streptococchi del gruppo A, C o G. Per una migliore identificazione delle colonie può essere effettuato il CAMP test, volto a verificare la produzione di un fattore capace di aumentare l'attività della β -emolisina di *Staphylococcus aureus*. Test metabolici utili per la distinzione dei GBS dagli enterococchi riguardano la capacità di idrolizzare l'ippurato (reazione positiva per GBS) e l'esculina (reazione negativa per GBS).

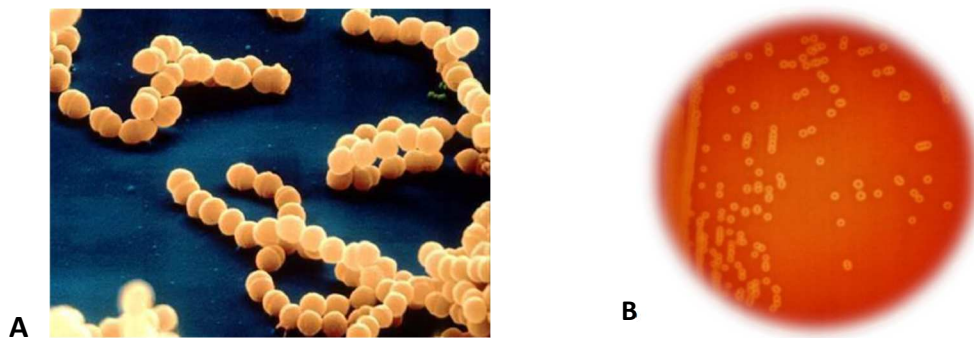


Figura 1. A. Nell'immagine al microscopio elettronico a scansione sono visibili streptococchi disposti in catenelle. B. Colonie β -emolitiche di *S. agalactiae* in una piastra di agar sangue.

1.2 Manifestazioni cliniche

S. agalactiae è un normale commensale del tratto intestinale e dell'apparato genito-urinario umano. Negli adulti causa raramente patologie, ma può dare origine a batteriemie, endocarditi, infezioni della cute e dei tessuti molli, polmoniti ed infezioni ossee, nel caso di pazienti fortemente debilitati (diabetici o malati cronici). La sua importanza, a livello clinico, è legata principalmente alla capacità di causare gravi infezioni neonatali (sepsi, meningiti,

polmoniti, artriti ed osteomieliti) e di provocare endometriti ed infezioni delle vie urinarie nella donna in gravidanza o in prossimità del parto.

S. agalactiae inizialmente era conosciuto come agente eziologico della mastite bovina, solo negli anni '70 ha assunto rilevanza nell'ambito della patologia umana quando i casi di sepsi neonatale ad esso correlati hanno subito un incremento notevole. Soltanto negli anni '90 sono state messe a punto strategie di prevenzione che hanno ridotto l'incidenza di tali infezioni. Nella maggior parte dei casi il microrganismo viene trasmesso per via ascendente (dalla madre al feto) in prossimità del parto o durante il parto, mentre più raramente l'infezione viene acquisita orizzontalmente da altri neonati o dal personale sanitario. Le manifestazioni cliniche legate all'infezione da GBS possono comparire entro la prima settimana dalla nascita (si parla di infezione *precoce*) o tra i 7 e i 90 giorni dopo la nascita (si parla di infezione *tardiva*). Nel caso di trasmissione verticale il fattore di rischio principale è rappresentato dalla colonizzazione vaginale della donna in gravidanza (Baldassarri, 2007). Per questo motivo le linee guida in tutto il mondo (MMWR, 2010) prevedono screening prenatali alla 35-37^a settimana di gestazione, volti a ricercare GBS nel tratto genitale della donna attraverso metodi colturali. Negli Stati Uniti la frequenza di colonizzazione nelle donne gravide varia tra il 10 e il 40% mentre in Europa è inferiore. Si può distinguere una colonizzazione ad alta carica o a bassa carica, a cui sono associati rischi di infezione diversi. In caso di positività le donne gravide vengono sottoposte ad una chemioprolifassi *intrapartum* che, influenzando sulla colonizzazione, riduce il rischio di infezione.

1.3 Fattori di virulenza

S. agalactiae è un normale colonizzatore del tratto gastrointestinale ed urogenitale, ma durante il processo di infezione può colonizzare altri distretti corporei quali la placenta, l'epitelio polmonare, il flusso sanguigno ed il cervello (Doran and Nizet, 2004; Nizet *et al.*, 1997). Inoltre, nonostante GBS sia un noto patogeno extracellulare, è stato dimostrato che la sua capacità di invadere le cellule umane gioca un ruolo importante nella sua patogenesi (Lindahl *et al.*, 2005). Per sopravvivere e causare la malattia, *S. agalactiae* ha evoluto un'ampia gamma di fattori di virulenza che sono coinvolti in diversi punti critici del processo infettivo come l'aderenza e la penetrazione delle barriere epiteliali ed endoteliali, l'elusione dei meccanismi di *clearance* immunologica e lo sviluppo di attività infiammatoria (Lindahl *et al.*, 2005).

I fattori di virulenza di *S. agalactiae* sono tipicamente componenti integrali della superficie batterica o prodotti di secrezione extracellulare (Figura 2).

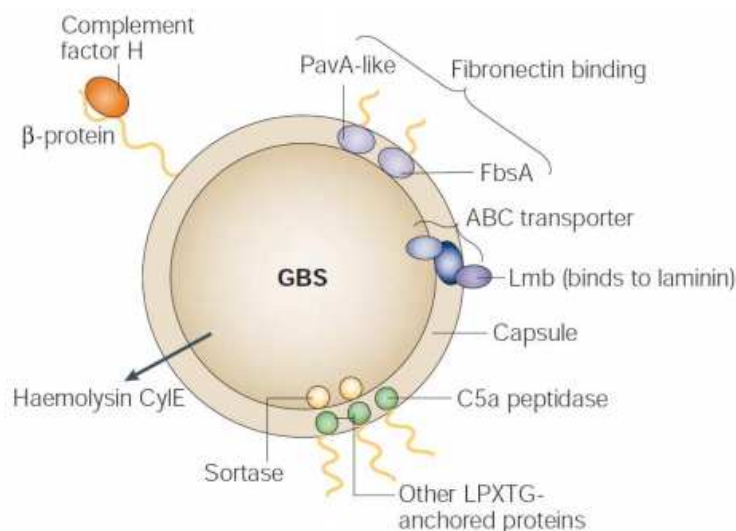


Figura 2. Principali fattori di virulenza di *S. agalactiae* (Mitchell, 2003).

Un fattore di virulenza molto importante in *S. agalactiae* è rappresentato dalla produzione di una capsula di natura polisaccaridica. Strutturalmente, la capsula è composta da unità ripetute di glucosio, galattosio, N-acetilglucosamina e contiene un residuo terminale di acido N-acetilneuramminico (Neu5Ac), più comunemente noto come acido sialico. Quest'ultimo ha una struttura identica ad uno zucchero che si ritrova anche sulla superficie di tutte le cellule del corpo umano. Sembra che GBS utilizzi l'acido sialico come forma di "mimetismo molecolare" con il quale, assomigliando alle cellule umane, evita il riconoscimento e l'instaurarsi della risposta immunitaria (Doran and Nizet, 2004). Inoltre, la capsula maschera altri determinanti antigenici presenti sulla superficie del batterio. Grazie a tutte queste caratteristiche la capsula conferisce resistenza all'opsonizzazione e alla fagocitosi mediata dal complemento.

La biosintesi della capsula di *S. agalactiae* è codificata dall'operone *cps* che è stato inizialmente identificato da Rubens *et al.* in un ceppo GBS di sierotipo III (Rubens *et al.*, 1993). L'operone *cps* ha una grandezza di circa 18 kb ed è costituito da 16-18 geni a seconda del sierotipo e può essere suddiviso in tre regioni principali (Cieslewicz *et al.*, 2005). La parte centrale dell'operone (*cpsE-L*) determina il sierotipo della capsula e comprende i geni che codificano per le glicosiltransferasi, la polimerasi (*cpsH*) e la flippasi (*cpsL*). Gli ultimi quattro geni dell'operone (*neuA-neuD*) codificano gli enzimi che sintetizzano l'acido sialico. Infine, i primi geni dell'operone (*cpsA-D*) non sono direttamente coinvolti nella biosintesi delle unità ripetitive del polisaccaride cellulare (CPS) (Cieslewicz *et al.*, 2001) (Figura 3).

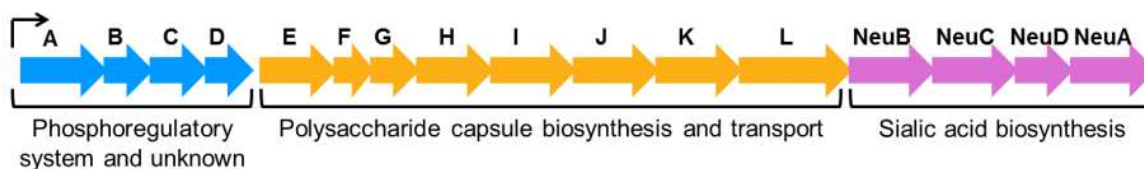


Figura 3. Organizzazione generale dell'operone *cps* di *S. agalactiae*.

Al momento sono state dimostrate 10 distinte varianti antigeniche capsulari (Ia, Ib, II-IX) e la sierotipizzazione è ancora il primo approccio epidemiologico per caratterizzare i ceppi di GBS (Slotved *et al.*, 2007). Studi epidemiologici effettuati negli Stati Uniti ed in Europa hanno dimostrato che i sierotipi Ia, Ib, II, III e V costituiscono la causa più frequente di infezione nell'uomo. Il sierotipo III è il più diffuso nelle infezioni neonatali (Phares *et al.*, 2008); in particolare, uno specifico clone di questo sierotipo, il complesso clonale CC17, è fortemente associato alle meningiti neonatali (Bellais *et al.*, 2012). Nelle infezioni adulte, il sierotipo predominante è il V (31% dei casi), seguito dal sierotipo Ia (Phares *et al.*, 2008). Negli Stati Uniti, tra i casi di infezioni neonatali precoci (EOD), i sierotipi più frequenti sono Ia (30%), III (28%), V (18%) e II (13%). Al contrario, nelle infezioni neonatali tardive (LOD), il sierotipo III rappresenta la metà di tutti i casi, principalmente di meningite; il resto sono prevalentemente sierotipi Ia (24%) e V (14%) (Phares *et al.*, 2008). Tuttavia, la distribuzione dei sierotipi può variare in base all'etnia e alla regione geografica considerata. Nella colonizzazione vaginale, negli Stati Uniti ed in Europa, i sierotipi predominanti sono il III e Ia, seguiti dai sierotipi II e V; in Giappone, sierotipi VI e VIII; negli Emirati Arabi Uniti, sierotipo IV; in diversi paesi africani sierotipo V (Lartigue *et al.*, 2011).

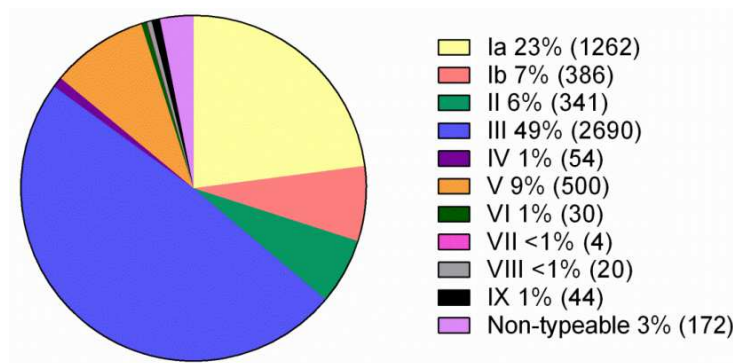


Figura 4. Distribuzione dei sierotipi di *S. agalactiae* nei paesi sviluppati, 1980-2011 (Edmond *et al.*, 2012).

Ceppi con simile composizione capsulare hanno dimostrato virulenza molto diversa, suggerendo che anche altri fattori di virulenza sono coinvolti nella patogenesi dei GBS (Creti *et al.*, 2004). Infatti, tra i fattori di virulenza dei GBS, sempre più interesse è rivolto alle proteine di superficie le quali sono coinvolte nella virulenza batterica e possono stimolare la protezione immunologica (Lindahl *et al.*, 2005). Il primo antigene di superficie evidenziato è stato chiamato antigene c o complesso C, ed è composto da due frazioni proteiche, una componente alpha ($C\alpha$), resistente alla tripsina ma sensibile alla pepsina ed una componente beta ($C\beta$), tripsina-sensibile (Lindahl *et al.*, 2005). Il complesso C è presente soprattutto nei sierotipi Ia, Ib e II ma raramente nei ceppi di sierotipo III che presentano un complesso proteico differente, il complesso R, ugualmente protettivo in modelli di infezione animale (Law *et al.*, 2005).

Oggi sono state identificate e caratterizzate diverse varianti antigeniche del componente $C\alpha$, tanto da parlare di una vera e propria famiglia di proteine di superficie designata *alpha-like protein* (Alp) *family*. Tutte le Alp hanno alto peso molecolare ed una struttura a mosaico che

comprende: un peptide segnale di 50 aminoacidi (aa), un dominio N-terminale di 170-180 aa, una regione intermedia costituita da unità ripetitive identiche, il cui numero è variabile da ceppo a ceppo ed un dominio C-terminale di 40-50 aa con un motivo LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) altamente conservato, coinvolto nell'ancoraggio alla parete cellulare (Figura 5).



Figura 5. Rappresentazione schematica dei domini delle proteine Alp: peptide segnale (S), regione N-terminale (N), regione intermedia di ripetizione (R), regione C-terminale (C).

L'espressione di una data proteina della famiglia *alpha-like*, sembra essere strettamente correlata con il tipo capsulare (Ramaswamy *et al.*, 2006). Attualmente sono state identificate sei varianti antigeniche principali della famiglia *alpha-like*: *alphaC*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4* ed *epsilon*. Tutte queste proteine sono codificate da geni allelici che presentano una struttura a mosaico (Gherardi *et al.*, 2007), generati dalla ricombinazione di moduli nello stesso locus cromosomico (Lachenauer *et al.*, 2000). Ogni ceppo esprime solo un membro della famiglia *alpha-like*, probabilmente all'interno di elementi mobili (Baldassari, 2007; Gherardi *et al.*, 2007). Vi è una notevole omologia di sequenza (40-60%) tra i membri della famiglia, ma nonostante ciò le cross-reattività sono limitate. Per quanto riguarda la funzione biologica, le proteine α sembrano facilitare l'ingresso del batterio nelle cellule epiteliali e attraverso gli strati della cervice umana, legandosi a glicosaminoglicani delle cellule ospiti (Gherardi *et al.*,

2007). Questi antigeni sono studiati quali possibili candidati per la formulazione di vaccini per la prevenzione dell'infezione neonatale.

Un altro fattore critico di virulenza di *S. agalactiae*, coinvolto nell'adesione ed invasione delle barriere cellulari, è la β -emolisina/citolisina (CylE). Questa tossina è la responsabile della lisi dei globuli rossi e causa il tipico alone più chiaro che circonda le colonie GBS quando sono coltivate su piastre di agar sangue. Inoltre, l'emolisina, ha un effetto litico sulle cellule dell'epitelio polmonare e della barriera emato-encefalica ed è la principale responsabile delle polmoniti gravi nelle EOD (Doran *et al.*, 2002; Nizet *et al.*, 1997). La β -emolisina/citolisina ha un ruolo anche nel processo di infiammazione, infatti, la formazione dei pori nei macrofagi può indurre apoptosi e la produzione di ROS che attivano il processo a cascata che causa la sepsi (Ring *et al.*, 2000).

Un'altra tossina di *S. agalactiae* è il CAMP factor. Questa proteina viene secreta all'esterno della cellula e si lega alla membrana *target* causando la formazione di pori ed andando ad innescare la lisi cellulare (Lang and Palmer, 2003). La ialuronato liasi, invece, è un fattore di virulenza che facilita la diffusione dei batteri andando a rompere i polimeri dell'acido ialuronico presenti nelle matrici extracellulari della placenta e del polmone (Liu and Nizet, 2004).

1.4 Terapia e profilassi

Nonostante in Asia ed in America siano stati recentemente riportati degli isolati con ridotta sensibilità alla penicillina (Kimura *et al.*, 2008; Longtin *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2015), nella pratica clinica, i β -lattamici (in particolare penicillina G, ampicillina, cefalosporine di terza generazione) rappresentano i farmaci di prima scelta sia per la profilassi *intrapartum* delle donne in gravidanza positive allo *screening* colturale, sia per la terapia delle infezioni in altri soggetti.

Vancomicina, macrolidi e lincosamidi rappresentano i farmaci di seconda scelta, in caso di reazioni allergiche nei confronti dei β -lattamici (Baldassarri *et al.*, 2007), ma di fatto, soprattutto i macrolidi, sono stati largamente utilizzati. Di conseguenza, nonostante l'attuazione di strategie preventive abbia ridotto l'incidenza delle infezioni neonatali precoci (EOD), l'uso dei macrolidi ha favorito l'emergenza e la diffusione dell'antibiotico-resistenza.

Considerando la crescente resistenza ad eritromicina e clindamicina, i fluorochinoloni possono rappresentare un'importante alternativa, almeno nella terapia delle infezioni di soggetti adulti non in gravidanza. Infatti, mentre le infezioni causate da *S. agalactiae* nei neonati e nelle donne in gravidanza sono ben documentate, l'epidemiologia dei pazienti con infezioni da questo batterio sta cambiando: sempre più frequentemente sono segnalate infezioni di varia natura in adulti non in gravidanza, sia femmine che maschi, e negli anziani, spesso immunocompromessi e ricoverati all'interno di strutture di assistenza a lungo termine (Wehbeh *et al.*, 2005).

1.5 Distribuzione delle antibiotico-resistenze in *S. agalactiae*

I β -lattamici rimangono gli antibiotici più comunemente usati per il trattamento delle infezioni da *S. agalactiae*, nonostante siano state già riportate le prime segnalazioni di una ridotta sensibilità alla penicillina G e ad altri β -lattamici. I primi isolati evidenziavano una ridotta sensibilità ai β -lattamici a causa dell'accumulo di mutazioni a livello della PBP2X, ma recentemente è stato osservato un alto livello di resistenza alle cefalosporine, dovuto a mutazioni non solo a livello della PBP2X ma anche della PBP1A (Kimura *et al.*, 2013).

Molto più significativo e rilevante è il progressivo aumento della resistenza ai farmaci di seconda linea, in particolar modo nei confronti di macrolidi e lincosamidi, i quali, come anticipato, costituiscono una valida alternativa per i pazienti con allergie ai β -lattamici o con infezioni meno gravi.

Per quanto riguarda la tetraciclina, anche se non è presa in considerazione per la terapia, è stato più volte riportato che la maggior parte dei GBS è resistente a questo antibiotico. In tutto il mondo infatti i valori di resistenza registrati sono sempre molto elevati (Da Cunha *et al.*, 2014).

Recentemente è emersa anche la resistenza ai chinoloni; la prima segnalazione è stata documentata in Giappone nel 2002 (Kawamura *et al.*, 2003), e successivamente si è rapidamente diffusa negli Stati Uniti, in Spagna, in Brasile ed in molti altri paesi (Wehbeh *et al.*, 2005; Biedenbach *et al.*, 2006; Mirò *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2012; Piccinelli *et al.*, 2015; Hays *et al.*, 2016).

1.6 Macrolidi, meccanismo d'azione e strategie di resistenza

I macrolidi sono una classe di antibiotici costituiti da un anello lattonico macrociclico a 14, 15 o 16 atomi. L'anello lattonico può presentare varie ramificazioni metiliche e può essere legato a due o più deossizuccheri mediante legami glicosidici.

La molecola capostipite dei macrolidi è l'eritromicina, caratterizzata da un lattone a 14 atomi di carbonio. Scoperta nel 1952, l'eritromicina è prodotta naturalmente da *Saccharolyspora erythraea*, una specie batterica appartenente agli attinomiceti e comunemente nota come *Streptomyces erythraeus*.

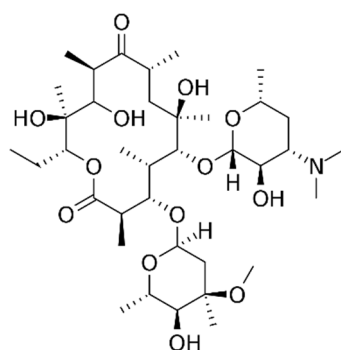


Figura 6. Struttura dell'eritromicina.

Al fine di ampliare lo spettro d'azione di tale antibiotico sono stati prodotti derivati semisintetici (azitromicina, claritromicina, chetolidi) con varie sostituzioni a livello del lattone; i nuovi derivati sono molecole maggiormente stabili, con una migliore capacità di assorbimento ed un numero inferiore di effetti collaterali (Roberts *et al.*, 1999).

I macrolidi sono oggi utilizzati nel trattamento delle infezioni delle alte e basse vie respiratorie, della cute e dei tessuti molli e nella cura delle malattie sessualmente trasmissibili. Essi hanno come bersaglio la subunità ribosomiale 50S; in particolare, legano l'RNA ribosomiale 23S in corrispondenza del sito catalitico della peptidil-trasferasi e impediscono l'allungamento della

catena peptidica durante la traduzione. Il meccanismo d'azione dei macrolidi è comune anche ad altre classi di antibiotici quali lincosamidi e streptogramina di tipo B.

Macrolidi, lincosamidi e streptogramina B, pur avendo una differente struttura chimica, condividono lo stesso target e sono spesso considerati insieme con la sigla MLS_B. La resistenza MLS_B è estesa a molti generi batterici e consiste in: modificazione enzimatica del bersaglio, efflusso attivo dell'antibiotico all'esterno della cellula, inattivazione dell'antibiotico e mutazioni a livello del bersaglio.

Nel primo caso, il *target* è rappresentato dall'rRNA 23S, che viene metilato a livello di uno o più residui di adenina in una regione altamente conservata del dominio V, ad opera di metilasi codificate dai geni *erm* (*erythromycin resistance methylase*), producendo una variazione della molecola che rende inaccessibile agli antibiotici MLS il sito catalitico della peptidil-trasferasi (fenotipo MLS, co-resistenza agli antibiotici MLS) (Weisblum, 1995).

Tra i geni *erm* il più diffuso è l'*erm*(B); la sua diffusione è legata principalmente all'associazione dello stesso con elementi genetici mobili che possono essere trasferiti orizzontalmente in modo intraspecifico e/o interspecifico. *erm*(B) è stato identificato in trasposoni non coniugativi come Tn917 e Tn551, in plasmidi ed in trasposoni coniugativi localizzati nei cromosomi.

Il secondo tipo di gene *erm* molto diffuso è *erm*(TR), identificato in *S. pyogenes* (Seppälä *et al.*, 1998), incluso nella sottoclasse *erm*(A) (Roberts *et al.*, 1999). Esso è ampiamente diffuso negli isolati di *S. pyogenes* ed in altre specie di streptococchi β-emolitici, compreso *S. agalactiae* mentre è raramente presente in *S. pneumoniae* (Camilli *et al.*, 2008).

Infine, un altro gene *erm* è *erm*(T), sporadicamente rilevato in passato negli streptococchi, è stato recentemente riportato in isolati non clonali di *S. pyogenes* e *S. agalactiae*. In entrambe le specie, è stato sempre localizzato in piccoli plasmidi strettamente correlati. Questo ha generato l'ipotesi che, sebbene non auto-trasmissibili, i plasmidi che veicolano il gene *erm*(T) possano diffondersi orizzontalmente nell'ambito della popolazione streptococcica mediante mobilizzazione *in trans* ad opera di altri elementi genetici mobili (Palmieri *et al.*, 2013; Compain *et al.*, 2014).

In generale i diversi alleli *erm* presentano una diversa regolazione dell'espressione fenotipica, la quale può essere costitutiva o inducibile. Mentre il determinante *erm*(B), largamente diffuso negli streptococchi, può essere espresso costitutivamente o in seguito ad induzione ed è usualmente associato ad una resistenza di alto livello, il gene *erm*(TR) è generalmente associato ad un fenotipo inducibile (Weisblum, 1995).

Nel caso di un'espressione costitutiva, i ceppi sono resistenti a tutti gli antibiotici macrolidi, lincosamidi ed alle streptogramine di tipo B (fenotipo MLS_B). Quando l'espressione è inducibile, i ceppi sono resistenti ai macrolidi a 14 (eritromicina, roxitromicina, e spesso l'oleandomicina) ed a 15 atomi di carbonio (azitromicina); rimangono invece attivi antibiotici come i macrolidi a 16 atomi (spiramicina, josamicina, miocamicina e midecamicina), i lincosamidi e le streptogramine di gruppo B.

Un ulteriore meccanismo di resistenza consiste nell'efflusso attivo dell'antibiotico all'esterno della cellula attraverso l'utilizzo di pompe ATP-dipendenti o di altri tipi di trasportatori (*Major Facilitator Transporters*). La resistenza all'eritromicina mediata da sistemi di efflusso attivo è dovuta prevalentemente alla presenza di geni codificanti delle pompe proteiche, denominati

geni *mef* (fenotipo M). Rispetto ai geni *erm*, i geni *mef* di solito producono una resistenza di livello inferiore, interessando solo i macrolidi a 14 e 15 atomi di carbonio (Sutcliffe *et al.*, 1996). Negli streptococchi sono state dimostrate diverse varianti, di cui le meglio caratterizzate sono *mef*(A) e *mef*(E), che risultano distribuite in modo non omogeneo nell'ambito degli streptococchi (Clancy *et al.*, 1996; Tait-Kamradt *et al.*, 1997). Altre varianti meno comuni sono state identificate in *S. pneumoniae* [*mef*(I)], in *S. pyogenes* [*mef*(O)] e in streptococchi beta-emolitici di gruppo B e G [*mef*(B), *mef*(G)] (Varaldo 2009).

Infine, la resistenza può essere legata allo sviluppo di mutazioni a livello delle sequenze codificanti per il dominio V dell'rRNA 23S e dei geni che codificano per le proteine ribosomiali L4 e L22. Questo tipo di mutazioni possono determinare un incremento della resistenza ai macrolidi, lincosamidi, streptogramine B, telitromicina e/o al linezolid sia nei Gram-positivi che nei Gram-negativi (Weisblum, 1995).

1.7 Chinoloni, meccanismo d'azione e strategie di resistenza

I chinoloni sono un gruppo di farmaci antibatterici di origine sintetica di rilevanza clinica, che hanno come struttura base la 4-oxo-1,4 diidrochinolina. I primi chinolonici utilizzati, sono stati l'acido nalidixico ed alcuni derivati (acido ossolinico, acido pipemidico) impiegati esclusivamente nel trattamento delle infezioni urinarie. Questo gruppo di molecole è considerato la prima generazione dei chinoloni. La seconda generazione di composti, rappresentata dallo sviluppo dei fluorochinoloni, presentava migliori proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche che ne consentivano l'utilizzo anche nel trattamento delle infezioni sistemiche. Le modifiche più importanti alla struttura del chinolone sono state

l'introduzione di un atomo di fluoro in sesta posizione dell'anello fenolico centrale e un anello piperazinico in posizione sette.

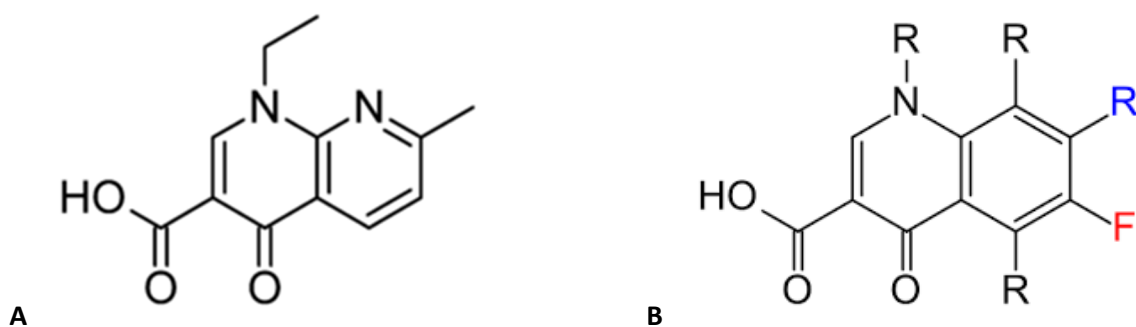


Figura 7. A acido nalidixico, B, fluorochinolone.

Il meccanismo d'azione dei fluorochinoloni si esplica attraverso la loro interazione con le topoisomerasi di tipo II (DNA girasi e topoisomerasi IV), enzimi essenziali per la replicazione del cromosoma e per la trascrizione e riparazione del DNA. Entrambi gli enzimi sono proteine tetrameriche costituite da subunità uguali a due a due, GyrA e GyrB per la DNA girasi, ParC e ParE per la topoisomerasi IV. L'inibizione dell'attività delle topoisomerasi batteriche determina una frammentazione del cromosoma, ed è responsabile dell'attività battericida (Hooper, 2002).

Rispetto a tale meccanismo d'azione dei fluorochinoloni, i microrganismi hanno sviluppato tre tipi di meccanismi di resistenza: (i) mutazioni cromosomiche che alterano gli enzimi target e la loro affinità al farmaco; (ii) mutazioni cromosomiche che causano un ridotto accesso al bersaglio, per riduzione della permeabilità o per aumentata espressione delle pompe di efflusso; e (iii) geni di resistenza acquisiti da plasmidi. Le alterazioni cellulari associate a

ciascun meccanismo non si escludono a vicenda e possono accumularsi causando alti livelli di resistenza ai chinoloni (Hooper and Jacoby, 2016).

Il meccanismo più comune di resistenza ad alto livello è dovuto a mutazioni all'interno di una regione cruciale posseduta da entrambi gli enzimi DNA girasi e topoisomerasi IV, definita *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR).

Le mutazioni determinano sostituzioni aminoacidiche che cambiano strutturalmente la proteina target, riducendo quindi l'affinità del complesso enzima-DNA per l'antibiotico (Figura 8a). Tali mutazioni possono essere singole o multiple, determinando, di conseguenza, livelli di MIC più o meno elevati: una singola mutazione produce un aumento moderato delle MIC mentre mutazioni multiple determinano elevati livelli di resistenza (Hooper, 2002). Tali resistenze mutazionali non sono trasferibili, se non verticalmente alla progenie.

Numerosi studi hanno dimostrato profonde differenze nello sviluppo della resistenza ai chinoloni nei batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Nei Gram-positivi mutazioni della topoisomerasi IV conferiscono un basso livello di resistenza, mentre, la comparsa di mutazioni nella DNA girasi, che costituisce il secondo bersaglio, produce la resistenza ad alto livello. Anche negli Streptococchi, in particolare nella specie *Streptococcus pneumoniae*, dove lo sviluppo della resistenza è ben documentato, le mutazioni si verificano dapprima nella topoisomerasi IV e successivamente nella DNA girasi, con una modalità *stepwise*. La resistenza ad alto livello si verifica quando entrambi gli enzimi risultano modificati.

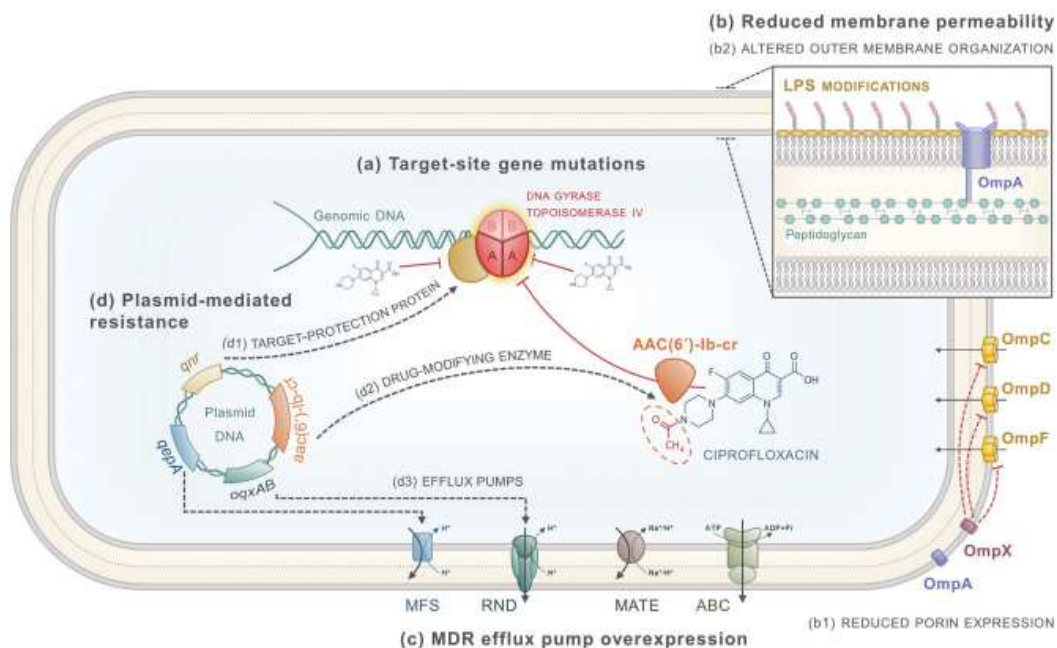


Fig. 8. Meccanismi di resistenza ai chinoloni.

Dal momento che i chinoloni devono attraversare gli involucri cellulari per raggiungere le proteine target, altri meccanismi di resistenza possono contribuire allo sviluppo della resistenza: (a) mutazioni delle proteine *carrier* della membrana citoplasmatica o delle porine della membrana esterna dei Gram-negativi, (b) l'espressione di pompe di efflusso o una combinazione di entrambi (Hooper and Jacoby, 2016) (Figura 8b).

Per esempio, nei Gram-negativi, la concentrazione intracellulare di antibiotico viene ridotta dalla combinazione di mutazioni che alterano l'organizzazione della membrana esterna, mentre nei batteri Gram positivi la riduzione della concentrazione intracellulare di antibiotico è causata, principalmente, da un'alterata espressione delle pompe di efflusso.

Ogni batterio di solito ha una serie di pompe di efflusso attivo, denominate *multidrug resistant (MDR) pumps* (Hooper, 2002), codificate da geni cromosomici. La resistenza a specifici farmaci si evidenzia in seguito ad una "overespressione" di tali proteine, determinata da mutazioni nei

geni codificanti (Figura 8c). La presenza di queste pompe MDR viene generalmente dimostrata inibendone l'attività con particolari sostanze. Gli inibitori appartengono a due categorie funzionali, chiamati enzimi di tipo 1 e di tipo 2. I primi inibiscono le pompe protoniche, i secondi le proteine ABC-transporter, cioè l'ATPasi. Una di queste pompe ABC-transporter, associata con la resistenza ai chinoloni, viene inibita dalla reserpina, un alcaloide vegetale, la cui tossicità richiede attenzione nella manipolazione.

Accanto a questi meccanismi classici di resistenza cromosomica, è stata di recente messa in evidenza la presenza di proteine di resistenza ai chinoloni (Qnr), codificate da geni trasmissibili attraverso plasmidi (PMQR). Le proteine Qnr appartengono alla famiglia delle proteine a ripetizione pentapeptidica e conferiscono resistenza ai chinoloni proteggendo fisicamente la DNA girasi e topoisomerasi IV dall'inibizione del chinolone (Figura 8d).

1.8 Cloramfenicolo, meccanismo d'azione e strategie di resistenza

Il cloramfenicolo, originariamente indicato come cloromicetina, è un vecchio antibiotico inizialmente ottenuto come prodotto di fermentazione da *Streptomyces venezuelae* (Ehrlich *et al.*, 1947).

A causa della relativa semplicità della sua struttura, è stato prodotto sinteticamente dal 1950. Sulla base della sua attività contro un'ampia gamma di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, il cloramfenicolo è stato inizialmente considerato un promettente agente antimicrobico.

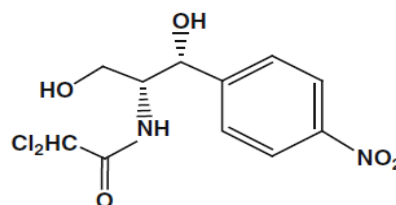


Figura 9. Struttura del cloramfenicolo.

Tuttavia, dalla metà degli anni '60 sono stati osservati gravi effetti avversi; inoltre, grazie alla disponibilità di agenti antimicrobici meno tossici ma con uno spettro di attività simile, il cloramfenicolo è ora utilizzato nella medicina umana solo per il trattamento di un piccolo numero di infezioni potenzialmente letali o per applicazioni topiche.

Il meccanismo d'azione del cloramfenicolo si esplica attraverso l'inibizione della sintesi delle proteine batteriche andando ad impedire l'allungamento della catena peptidica interferendo con il legame del tRNA nel sito A (McCoy *et al.*, 2011). La sua attività batteriostatica si basa su un legame reversibile al centro della peptidiltransferasi nella subunità ribosomiale 50S dei ribosomi 70S (mentre è inattivo nei confronti dei ribosomi 80S).

Nel corso degli anni, i batteri hanno sviluppato una serie di meccanismi di resistenza al cloramfenicolo. Il primo e il più frequente è la resistenza batterica dovuta a inattivazione enzimatica mediante acetilazione del farmaco attraverso diversi tipi di cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT) che inattivano l'antibiotico convertendolo successivamente in 3-acetile e 1,3-diacetile. Tuttavia, sono stati riportati anche altri meccanismi di resistenza, come i sistemi di efflusso, inattivazione da fosfotransferasi, mutazioni del sito bersaglio e della permeabilità delle membrane (Schwarz *et al.*, 2004).

Esistono due tipi di enzimi CAT, entrambi con una struttura trimerica composta da tre monomeri identici (Murray and Shaw, 1997). I CAT classici, codificati dai geni *catA* (Schwarz *et al.*, 2004; Roberts and Schwarz, 2009), rappresentano un gruppo molto diversificato di enzimi, i cui membri mostrano un'identità complessiva di circa il 44%.

Altri tre gruppi di enzimi CAT classici sono stati denominati in base ai plasmidi (pC221, pC223 /pSCS7 e pC194), su cui i loro geni sono stati identificati per la prima volta.

Il secondo tipo di enzimi CAT, codificato dai geni *catB* (Murray and Shaw, 1997; Schwarz *et al.*, 2004; Roberts and Schwarz, 2009), è solo lontanamente collegato con i classici CAT; essi sono strutturalmente simili alle acetiltransferasi coinvolte nella resistenza alle streptogramine A. (Murray and Shaw, 1997). Di solito, questi enzimi CAT conferiscono MIC più basse al cloramfenicolo rispetto alle classiche cloramfenicolo acetiltransferasi.

Diversi CAT di tipo A sono stati identificati in numerosi streptococchi (Schwarz *et al.*, 2004). Tra questi, il gene *catQ*, una rara variante dei geni *cat* di tipo A, era stato originariamente trovato nel cromosoma di *Clostridium perfringens* (Rood *et al.*, 1989; Bannam & Rood, 1991) e diversi anni dopo è stato identificato e caratterizzato in *S. pneumoniae*, con il 96,2% di identità col il gene *catQ* di *C. perfringens* (Mingoia *et al.*, 2007).

1.9 Elementi genetici mobili e contributo alla diffusione orizzontale dei determinanti di resistenza

In *S. agalactiae*, così come in altre specie di streptococchi, la diffusione della resistenza a molti farmaci è mediata da diversi determinanti genetici che sono inseriti in una grande varietà di elementi genetici mobili (MGE). Gli elementi più rappresentativi sono stati indicati recentemente come *integrative and conjugative elements* (ICEs), vale a dire elementi genetici mobili auto-trasmissibili in grado di sintetizzare autonomamente sia il complesso “macchinario” necessario per la coniugazione, sia tutte le strutture coinvolte nella regolazione e nel controllo della propria escissione dal cromosoma e della loro propagazione orizzontale.

Il movimento orizzontale di un ICE ha inizio con (i) l'escissione dal cromosoma ospite e con la formazione di un intermedio circolare, (ii) successivamente una copia dell'elemento viene trasferita alla cellula ricevente attraverso un complesso proteico codificato dall'ICE stesso, al termine del processo (iii) le due copie dell'ICE, presenti nel donatore e nel ricevente, si integrano sui rispettivi cromosomi (Fig.10).

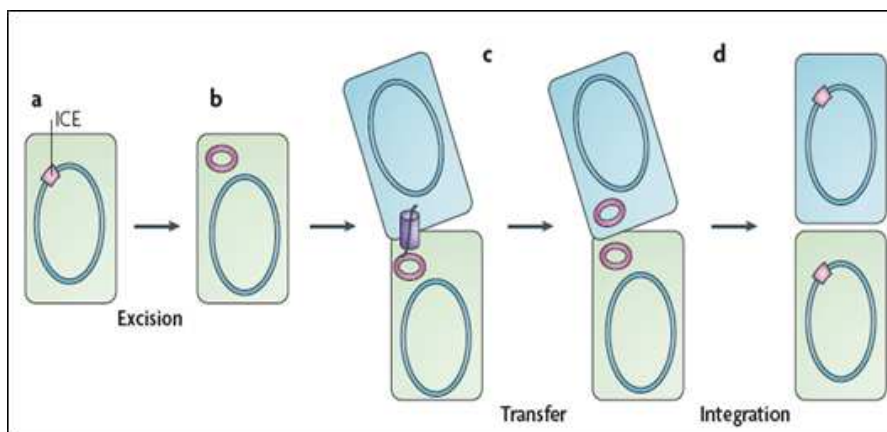


Figura 10. Rappresentazione schematica del ciclo vitale di un ICE: l'elemento integrativo coniugativo (ICE) risulta integrato in un sito cromosomico mediante due sequenze specifiche sulla destra (*attR*) e sulla sinistra (*attL*). L'escissione avviene con la formazione di una molecola circolare mediante la ricombinazione tra *attL* e *attR* e la formazione di un sito *attP* nell'ICE e un sito *attB* nel cromosoma. Durante la coniugazione, donatore e ricevente sono a stretto contatto e un DNA a singolo filamento è trasferito al nuovo ospite mediante la replicazione a *rolling circle*. A seguito del trasferimento, la DNA polimerasi del nuovo ospite sintetizza il filamento complementare. Il DNA circolare così formato si integrerà nel cromosoma del nuovo ospite tramite i siti *attP* e *attB*.

Questi elementi combinano quindi caratteristiche peculiari di altre classi di elementi genetici mobili: i fagi (che si integrano ed escindono dal cromosoma, ma non sono trasmissibili via coniugazione), i trasposoni (in grado di integrarsi nel cromosoma e di staccarsi da esso, ma che non sono trasmessi orizzontalmente) e i plasmidi (unità replicative indipendenti che, se

coniugativi, possono trasferire da cellula a cellula). Sulla base delle conoscenze attuali, gli ICE, a differenza dei plasmidi, non possono però essere mantenuti in uno stato extracromosomico e non sono dotati di replicazione autonoma (Wozniak and Waldor, 2010).

Un ICE è caratteristicamente organizzato in una struttura modulare, in cui i geni che presiedono ad una data funzione sono organizzati in *cluster* (Burrus and Waldor, 2004; Roberts and Mullany, 2009). I moduli funzionali essenziali sono tre, e provvedono rispettivamente a: integrazione e escissione (*maintenance modules*), coniugazione (*dissemination modules*) e regolazione (*regulation modules*). Pur mantenendo la struttura base modulare, i meccanismi e i geni coinvolti in queste funzioni variano a seconda degli ICEs considerati (Burrus and Waldor, 2004; Wozniak and Waldor, 2010). I tre moduli che costituiscono la struttura base degli ICEs rappresentano uno *scaffold* sul quale possono inserirsi anche altri tipi di geni detti “geni cargo”. Sono stati identificati degli *hot spots* all’interno dei quali questi elementi possono inserirsi ma il meccanismo di inserzione rimane tutt’ora non chiarito. Probabilmente questi geni si inseriscono nello *scaffold* tramite trasposoni o meccanismi di ricombinazione omologa.

Di grande rilievo risulta la documentata associazione tra singoli ICE e una vasta gamma di fenotipi, compresa la resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti e la capacità di degradare composti aromatici; ma interessanti sono anche la capacità di colonizzare un ospite eucariotico, di fissare l’azoto e di promuovere la virulenza e la formazione di biofilm (Wozniak and Waldor, 2010).

1.10 Distribuzione degli ICE in *S. agalactiae*

L'analisi di numerosi genomi batterici completi ha dimostrato che gli ICE, anche se sono stati caratterizzati solo recentemente, sono largamente diffusi nel mondo microbico e rappresentano una quota variabile di DNA che può contribuire enormemente all'adattabilità e alla sopravvivenza batterica. Recenti studi hanno dimostrato che la loro presenza è maggiore rispetto a quella dei plasmidi coniugativi in tutte le specie procariotiche (Guglielmini *et al.*, 2011).

L'importante ruolo svolto dall'HGT nell'evoluzione del genoma batterico di *S. agalactiae* può essere dimostrato dalla capacità dello stesso di acquisire *in vitro*, mediante coniugazione, frammenti molto ampi di DNA (da 21 kb fino a 334 kb). Inoltre, l'analisi della distribuzione dei polimorfismi nei genomi derivanti da isolati umani mostra come ogni cromosoma è in realtà un mosaico di frammenti con origine ancestrale differente.

In uno studio del 2005 è stato confrontato il DNA totale di otto ceppi di *S. agalactiae*, rappresentanti i 5 principali sierotipi che causano infezioni neonatali nell'uomo (Ia, Ib, II, III, V). Lo studio rivela un'organizzazione composita del cromosoma caratterizzata da uno scheletro stabile in cui si inseriscono dalle 11 alle 14 regioni variabili, molte delle quali sono rappresentate da elementi genetici mobili, in particolare ICE ed elementi correlati: *integrative and mobilizable elements* (IMEs) e *cis mobilizable elements* (CIMEs) (Brochet *et al.*, 2008).

Studi comparativi sul genoma di *Streptococcus agalactiae* hanno evidenziato che circa i due terzi delle regioni variabili del genoma sono composti da elementi genetici che appartengono a due grandi famiglie, vale a dire Tn916 e ICESa2603. La famiglia Tn916 è ampiamente distribuita in numerosi microorganismi, includendo anche importanti patogeni umani come

Enterococcus faecalis, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. (Roberts and Mullany, 2011).

ICESa2603 (~54 kb) è stato identificato per la prima volta in *S. agalactiae* 2603 V/R (Tettelin *et al.*, 2002): esso veicola la resistenza a diversi metalli pesanti, spesso in associazione con geni di antibiotico-resistenza ed è trasmissibile a *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* (Haenni *et al.*, 2010). ICESa2603 ha un unico sito di integrazione, corrispondente al terminale 3' del gene *rplL*, che codifica per la proteina L7/L12 della subunità ribosomiale 50S.

Sono stati rilevati ICE di tipo ICESa2603 in numerosi isolati clinici di *Streptococcus* spp. sia in specie umane che animali, provenienti dall'Europa e dall'Asia. In particolare, ad oggi, derivati della famiglia ICESa2603 sono stati identificati in sei specie di streptococco: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Davies *et al.*, 2009; Palmieri *et al.*, 2012), *S. pasteurianus* (Lin *et al.*, 2011), *S. thermophilus* (Delorme *et al.*, 2011), *S. lutetiensis* (Bjorkeng *et al.*, 2013) e con maggiore frequenza in *S. suis* (Chen *et al.*, 2007; Holden *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016) (Figura 11).

Pertanto, il trasferimento genetico orizzontale gioca un ruolo importante nella trasmissione dei membri della famiglia ICESa2603 all'interno del genere *Streptococcus*, contribuendo all'evoluzione degli ICE stessi e alla disseminazione di nuove combinazioni di geni di resistenza negli isolati clinici umani.



Figura 11. Organizzazione genomica della famiglia ICESa2603 (Huang *et al.*, 2016).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi batterici

Una collezione costituita da 368 ceppi di *S. agalactiae*, isolati da diversi materiali clinici nel periodo 2010-2016 presso tre ospedali regionali (Ospedali Riuniti Umberto I di Ancona Torrette, Ospedale provinciale di Jesi ed Ospedale provinciale di Fano), precedentemente caratterizzati per la resistenza a penicillina, macrolidi, lincosamidi e tetraciclina è stata analizzata per la sensibilità ai fluorochinoloni e al cloramfenicolo.

L'identificazione dei ceppi veniva effettuata: (i) osservando la presenza di β -emolisi, mediante semina su idoneo terreno al sangue [Blood Agar Base (BAB) addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone]; (ii) saggiando la resistenza alla bacitracina; (iii) confermando l'appartenenza al gruppo B di Lancefield utilizzando il test rapido di agglutinazione al lattice "SLIDEX Strepto Plus" (BioMerieux 69280 Marcy l'Etoile – France).

I ceppi venivano conservati in glicerolo a -80°C. Prima dell'esecuzione degli esperimenti gli isolati venivano fatti crescere per 24 h a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ in *Blood Agar Base* (BAB) (Oxoid, Basingstoke, UK) addizionato con il 5% di sangue di montone o di cavallo.

2.2 Antibiotici

Per i test di sensibilità sono stati utilizzati i seguenti antibiotici in polvere: eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloramfenicolo, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin (Sigma Aldrich Co, Milano), levofloxacin (Aventis Pharma, Lainate, Italia), moxifloxacin (Bayer Farmaceutici, Milano), trovafloxacin (Pfizer Italiana, Roma) e prulifloxacin (Angelini ACRAF, Pomezia, Italia). Tutti gli antibiotici in esame venivano sospesi in solventi appropriati ad una concentrazione finale di 10 g/Lm stoccati in aliquote e conservati a -20°C fino al momento dell'uso. Per l'esecuzione dell'antibiogramma (metodi qualitativi) sono stati utilizzati dischetti acquistati dalla ditta OXOID (OXOID, Garbagnate, MI).

2.3 Test di sensibilità agli antibiotici: antibiogramma e MIC

La sensibilità agli antibiotici è stata determinata, inizialmente, mediante il test di diffusione in *Mueller Hinton Agar* (MHA) addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone, secondo le procedure standard internazionali riportate dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2016). In breve, i ceppi in esame, dopo crescita *overnight* a 37°C in piastre di BAB addizionato con sangue di montone al 5%, venivano sospesi in *Mueller Hinton brodo* (MHB) sino a raggiungere una densità ottica (OD₆₂₅) di 0,1, corrispondente a circa 1 x 10⁸ Unità Formanti Colonia per ml (CFU/ml) e quindi uniformemente distribuiti sulla superficie di piastre di *Mueller Hinton Agar* (MHA) contenenti il 5% di sangue di montone. I dischetti degli antibiotici da saggiare vengono applicati sulla superficie dell'agar ad una distanza opportuna per non interagire tra loro, con l'eccezione dei dischetti di eritromicina (ERY, 15 µg) e di clindamicina (CLI, 2 µg) che erano posizionati ad una distanza di 12-16 mm (dal bordo dei rispettivi dischetti), al fine di valutare il fenotipo di resistenza inducibile alla clindamicina (CLSI,

2016) e fornire una preliminare interpretazione del meccanismo genetico che sottende la resistenza agli antibiotici MLS_B. Dopo 18-24 h di incubazione (37°C, atmosfera al 5% di CO₂) i risultati erano interpretati in accordo con i valori di riferimento dei due comitati internazionali EUCAST e CLSI (www.eucast.org; CLSI, 2016).

Le MIC a tutti gli antibiotici sono state determinate con il metodo di microdiluizione in brodo, conformemente a quanto raccomandato dal CLSI (CLSI, 2016). Le sospensioni batteriche venivano preparate in *Müller-Hinton cation adjusted* (CAMH) brodo (Oxoid), addizionato al 3% di sangue lisato, e l'inoculo era standardizzato in modo da contenere 5×10^5 Unità Formanti Colonia (UFC)/ml. Le piastre microtiter venivano poi incubate a 37°C per 18-24 h. Nello studio della resistenza ai chinoloni, sono stati determinati i valori di MIC di levofloxacin e ciprofloxacin anche in presenza di reserpina (10 µg/ml) che rappresenta un inibitore specifico delle pompe proteiche coinvolte nell'efflusso attivo. *S. pneumoniae* ATCC 49619 era utilizzato come controllo di qualità in tutti i saggi di sensibilità. Per quanto riguarda l'interpretazione dei risultati ottenuti con i diversi chinoloni sono stati utilizzati, quando disponibili, i dati forniti dai due comitati, CLSI ed EUCAST. Per la prulifloxacin è stato considerato un valore di ≥ 4 µg/ml come *breakpoint* di resistenza (Montanari *et al.*, 2005). Il medesimo valore è stato utilizzato per interpretare i risultati ottenuti con altre molecole chinoloniche per le quali non erano disponibili i valori di riferimento dei comitati internazionali. La Tabella successiva riporta i valori di *breakpoint* e i diversi riferimenti utilizzati per l'interpretazione dei risultati.

Tabella 1. Valori di riferimento per l'interpretazione della MIC per *Streptococcus* spp. β -emolitici.

ANTIBIOTICO	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
CLSI 2016			
Levofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Ofloxacin	≤ 2	4	≥ 8
Trovafoxacin	≤ 1	2	≥ 4
EUCAST 2016			
Levofloxacin	≤ 1	-	> 2
Moxifloxacin	≤ 0.5	-	> 1
Norfloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Montanari <i>et al.</i> 2005			
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Norfloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Prulifloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Sparfloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Trovafoxacin	≤ 1	2	≥ 4

2.4 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA totale è stata eseguita mediante il kit *GenElute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma Aldrich Co, St Louis, USA). I ceppi batterici erano inoculati in *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37 °C; le brodoculture così ottenute erano prima centrifugate (13'000 g per 2 minuti), poi risospese in 200 μl di *Lysozyme Solution* contenente lisozima (Sigma) alla concentrazione finale di 45 mg/ml e, infine, incubate a 37°C per 3 ore. Successivamente, venivano aggiunti 200 μl di *Lysis Solution* e 20 μl di *Proteinasi K* (Sigma), per la digestione delle proteine. I campioni erano quindi mantenuti a 55°C per 10 minuti. In

seguito, alla sospensione venivano aggiunti 200 µl di etanolo assoluto; dopo aver mescolato per inversione, i campioni erano trasferiti nelle colonnine e centrifugati a 6.500 g per 1 minuto. Dopo aver eliminato l'eluato, venivano effettuati due lavaggi aggiungendo alle colonnine 500 µl di Wash Solution. Dopo il primo lavaggio si centrifugava a 6.500 g per 1 minuto, dopo il secondo a 12.000 g per 3 minuti. Le colonnine erano quindi trasferite in nuove eppendorf e si aggiungevano 200 µl di *Elution Solution*. Seguiva una centrifugazione a 6.500 g per 1 minuto. L'eluizione veniva ripetuta una seconda volta e il DNA risultante era conservato a -20°C.

2.5 Saggi di amplificazione

Per evidenziare i singoli determinanti genetici e per lo studio dei meccanismi di resistenza sono stati eseguiti numerosi saggi di PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La PCR è stata inoltre impiegata per poter mappare regioni estese di DNA e per le procedure di sequenziamento. Le reazioni di amplificazione venivano effettuate seguendo le condizioni riportate per l'utilizzo di ogni singola coppia di primer. Quando negli esperimenti di amplificazione le dimensioni attese del prodotto di PCR risultavano superiori alle 3 kb veniva utilizzata la *Ex Taq™ system* (Takara Bio, Shiga, Japan), mentre per tutte le altre reazioni di PCR è stata impiegata la *DreamTaq* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Tabella 2. Principali coppie di *primer* utilizzate negli esperimenti di PCR.

<i>Gene amplificato</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenza (5'-3')</i>	<i>Bibliografia</i>
<u>Geni di resistenza</u>			
<i>cat</i> _{PC194}	F2	GAAGAAAGCAGACAAGTAAGCCTCC	Widdowson <i>et al.</i> , 2000
	R3	GGGCAGGTTAGTGACATTAG	Widdowson <i>et al.</i> , 2000
<i>cat</i> _{PC221}	cat221-F	TAGAAAATTGGGATAGAAAAG	Morici <i>et al.</i> , 2016
	cat221-R	TCCAATCATCTACCCTATG	Morici <i>et al.</i> , 2016
<i>catQ</i>	catQ1	TAGAAAGCCATACTTTGAGC	Del Grosso <i>et al.</i> , 2011
	catQ2	CATGATGCACCTGTACAGAC	Del Grosso <i>et al.</i> , 2011
<i>mef(I)</i>	MEFA1	AGTATCATTAATCACTAGTGC	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
	MEFA2	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>erm</i> (TR)	TR ₁	ATAGAAATTGGGTCAGGAAAAGG	Kataja <i>et al.</i> , 1998
	TR ₂	AATTGATTTTTAGTAAAAAGAAC	Kataja <i>et al.</i> , 1998
<i>erm</i> (B)	ERMB1	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
	ERMB2	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>erm</i> (T)	erm(T) forward	CCGCCATTGAAATAGATCCT	Woodbury <i>et al.</i> , 2008
	erm(T) reverse	GCTTGATAAAATTGGTTTTTGG	Woodbury <i>et al.</i> , 2008
<i>tet</i> (M)	TETM2	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
	TETM3	ATGGAAGCCCAGAAAGGAT	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
<i>tet</i> (O)	TETO1	AACCTAGGCATTCTGGCTCAC	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
	TETO2	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
<u>Geni di ricombinasi</u>			
<i>int</i> _{Tn5252}	INTF	AGTAACGTGGACTAAGATG	Mingoia <i>et al.</i> , 2011
	INTR	ACTACTGGTGATGAAGCG	Mingoia <i>et al.</i> , 2011
<i>int</i> _{ICESp23FST81}	intICE-F	TATCAGCGTGTCCTAATCG	Mingoia <i>et al.</i> , 2011

<i>int</i> _{ICESa2603}	intICE-R	AATCAACAGGGACTACCG	Mingoia <i>et al.</i> , 2011
	intF	GATCTTGAATCGATCCAGT	Palmieri <i>et al.</i> , 2012
<i>tndX</i> _{IMESp2907}	intR	TTCACCTGCTGGAGTTTTTG	Palmieri <i>et al.</i> , 2012
	tndX-F	AATGATGGAGTAGATACCTTTC	Mingoia <i>et al.</i> , 2016
	tndX-R	CTTCAAGATCTTCTTTAACAATC	Mingoia <i>et al.</i> , 2016

PCR mapping di ICESag236

Amplicone^a

a	<i>int</i> ₂₆₀₃ (SAG1247) ^b	intR	TTCACCTGCTGGAGTTTTTG	Palmieri <i>et al.</i> , 2012
	SAG1250	relF	TTGATTTTCTGACTATGTGG	Morici <i>et al.</i> , 2016
b	SAG1250	relR	TCTTGGAAACATTCATACTTAGC	Morici <i>et al.</i> , 2016
	ORF13 ^c	primF	CTGTTCAAGAAAATAGAGAGAG	Mingoia <i>et al.</i> , 2014
c	ORF13	primR	GCATCATCACAATCTACCGC	Mingoia <i>et al.</i> , 2014
	ORF18	M6	GTTAGAACCATTAAGTGAGC	Mingoia <i>et al.</i> , 2014
d	ORF18	R18	GTAACCTTCTAAATCTTGGTC	Mingoia <i>et al.</i> , 2014
	<i>catQ</i>	catQ1	TAGAAAGCCATACTTTGAGC	Del Grosso <i>et al.</i> , 2011
e	<i>catQ</i>	catQ2	CATGATGCACCTGTACAGAC	Del Grosso <i>et al.</i> , 2011
	<i>mef(I)</i>	MEFA1	AGTATCATTAATCACTAGTGC	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
f	<i>mef(I)</i>	MEFA2	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
	ORF46	27R	TTCTGGTGACAACTACTGG	Morici <i>et al.</i> , 2016
g	intergenic region	28F	GATGACTTACTGAACCTG	Mingoia <i>et al.</i> , 2014
	ORF54	21R	TTAGCCTCCTACTTGGTCG	Mingoia <i>et al.</i> , 2011

h	ORF56 <i>repA</i> (ORF65)	CTRfor NewORF6 α	GCCATTCGTTCTGTTGTTT ATGCTCTTGACAATGTTTCG	Mingoia <i>et al.</i> , 2014 Mingoia <i>et al.</i> , 2011
i	<i>repA</i> (ORF65) SAG0064_01205 ^d	ICE-RepA 1205F	AAGCGAACATTGTCAAGAGC GTAGAGATAGATAAGAACTGTG	Mingoia <i>et al.</i> , 2014 Morici <i>et al.</i> , 2016
j	SAG0064_01205 SAG0064_01230	1205R 1230F	TCATCATCAAAACCCATAAGTC AGTAGAAGCGGATAGTTTGG	Morici <i>et al.</i> , 2016 Mingoia <i>et al.</i> , 2016
k	SAG0064_01225 <i>tndX</i> _{IMESp2907} ^e	1225R tndX-F	GGACATCATCTGTTTCAGCC AATGATGGAGTAGATACCTTTC	Morici <i>et al.</i> , 2016 Mingoia <i>et al.</i> , 2016
l	<i>tndX</i> _{IMESp2907} <i>erm</i> (TR)	tndX-R TR ₁	CTTCAAGATCTTCTTTAACAATC ATAGAAATTGGGTCAGGAAAAGG	Mingoia <i>et al.</i> , 2016 Kataja <i>et al.</i> , 1998
m	<i>erm</i> (TR) SAG0064_01255 ^d	TR ₂ 7F	AATTGATTTTTAGTAAAAAGAAC TGGATACTTTAAGAAGCGTG	Kataja <i>et al.</i> , 1998 Mingoia <i>et al.</i> , 2016
n	SAG0064_01255 SAG1280 ^b	7R SNF2F	TTTATTCCTCCTCGTTTTCTTC TACTTCACTTTGAGACAGATG	Mingoia <i>et al.</i> , 2016 Palmieri <i>et al.</i> , 2012
o	SAG1280 SAG1287	SNF2R virBF	TAGTTGAGTTACCGAGGC GGTCGAATGGGTCTTTGTCT	Palmieri <i>et al.</i> , 2012 Palmieri <i>et al.</i> , 2012
p	SAG1287 SAG1299	virBR repARinv	GCTTGGTGTGTTGTGGGATC GGATTGATGAGGATGGGGC	Palmieri <i>et al.</i> , 2012 Mingoia <i>et al.</i> , 2016
<u>Sito di integrazione cromosomica^b</u>				
	SAG1293	CAAX-R	CTATTCCAAAGTAAATGTAAG	Mingoia <i>et al.</i> , 2016

<i>rplL</i> (SAG1301)	rplLF	AAAGTTGGCGTTATCAAAG	Palmieri <i>et al.</i> , 2012
<u>Amplificazione delle regioni QRDR</u>			
<i>gyrA</i>	BSBGYRAF	CGAGTTTTATCGATTACGCC	Biedenbach <i>et al.</i> , 2006
	BSBGYRAR	CCTACTGGTGCCTTGGTGAT	Biedenbach <i>et al.</i> , 2006
<i>parC</i>	BSBPARCF	AAGGGATTTTCGCAAATCTGC	Biedenbach <i>et al.</i> , 2006
	BSBPARCR	CTGGCGCTATCATTCAAGGA	Biedenbach <i>et al.</i> , 2006

^aVedi Figura 20.

^b Ad eccezione dei geni di integrasi e di resistenza, e se non diversamente specificato, le designazioni sono in base alla numerazione delle ORF di *Streptococcus agalactiae* 2603V/R (accession no. AE009948).

^cIn accordo alla numerazione delle ORF di ICE*Spn529IQ* (accession no. HG965092).

^d In accordo alla numerazione delle ORF di *S. agalactiae* 37741 (accession no. ALQQ01000033).

^eAd eccezione dei geni di resistenza e di trasposasi, le designazioni sono in base alla numerazione delle ORF di IMESp2907 di *S. agalactiae* SagTR7 (accession no. KP898896).

2.6 Elettroforesi in gel di agarosio

I prodotti di amplificazione venivano separati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% in *Tris Acetato EDTA* (TAE) contenente 1X di *Green Gel* (Fisher Molecular Biology, Roma, Italia). A 10 µl di ciascun campione venivano aggiunti 2 µl di *Track Dye 6X* per la visualizzazione del fronte di migrazione; campioni e pesi standard [*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific)] venivano quindi caricati nei pozzetti del gel e sottoposti ad una corrente di 70-80 Volt per 1 h. Al termine della migrazione elettroforetica il gel era visualizzato su transilluminatore a raggi UV e poi fotografato con una macchina fotografica digitale.

2.7 Esperimenti di restrizione per l'analisi delle regioni QRDR

I prodotti di amplificazione dei geni *gyrA* (616 bp) e *parC* (495 bp) sono stati analizzati mediante digestione con l'enzima di restrizione *HinI*, dal momento che le mutazioni classiche che compaiono nelle rispettive regioni QRDR (Ser81 e Ser79, rispettivamente per *GyrA* e *ParC*) sono cambiamenti di un singolo nucleotide all'interno della sequenza riconosciuta dall'enzima. In tutti gli esperimenti è stato utilizzato un campione di DNA genomico di *S. agalactiae* ATCC 2603V/R, sensibile ai fluorochinoloni, come ceppo *wild type*. In Tabella 3 sono indicati il numero dei siti *HinI* e i prodotti di digestione attesi per gli amplificati dei geni *gyrA* e *parC* del ceppo di riferimento *wt*. La reazione di restrizione è stata condotta in un volume totale di 15 µl secondo la procedura precedentemente riportata per l'analisi di restrizione di *S. pneumoniae* (Pan *et al.*, 1996) e separato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2%

aggiungendo, oltre al marker DNA 100 bp plus (ThermoFisher Scientific), anche un campione di controllo non digerito.

Tabella 3. Siti *HinfI* e dimensione attesa dei prodotti di digestione per i geni *gyrA* e *parC* nel ceppo wild type ATCC 2603V/R.

	<i>Siti HinfI</i>	<i>Dimensione attesa dei prodotti dopo digestione HinfI (bp)</i>
<i>gyrA</i>	2	191-321-104
<i>parC</i>	1	429-66

2.8 Purificazione, quantificazione e sequenziamento

Per le analisi di sequenziamento tutti i prodotti di PCR erano purificati mediante il sistema *GenElute™ PCR Clean-Up Kit* (Sigma Aldrich Co, St Louis, USA), che separa il DNA amplificato sulla base di metodi cromatografici. Il kit prevede l'utilizzo di colonnine (*GenElute plasmid mini spin column*, Sigma-Aldrich) la cui resina trattiene l'amplificato separandolo dai componenti della miscela di reazione. Le colonnine venivano inserite in apposite eppendorf, venivano aggiunti 500 µl di *Column Preparation Solution*, si centrifugava a 12.000 rpm per 1 minuto e l'eluato veniva eliminato. Intanto in una nuova eppendorf si preparava il campione da purificare, aggiungendo 200 µl di *Binding solution* a 40 µl di prodotto di PCR e questa soluzione veniva trasferita nella colonnina. Dopo una centrifugazione di 1 minuto a 13.000 rpm veniva eliminato l'eluato e si aggiungevano 500 µl di *Wash solution*. Si centrifugava ancora a 13.000 rpm per un minuto, per allontanare i componenti non legati alla resina, quindi si toglieva l'eluato e si centrifugava a 13.000 rpm per 2 minuti, per eliminare l'eccesso di etanolo. A

questo punto le colonnine venivano trasferite in nuove eppendorf, e venivano aggiunti 50 µl di *Elution solution*, si centrifugava a 13.000 rpm per 1 minuto in modo da eluire il DNA amplificato legato alla matrice cromatografica.

La concentrazione del DNA ottenuto (in µg/ml) è stata misurata mediante metodo fluorimetrico (Qubit® invitrogen). Il DNA purificato veniva prima diluito 1:10. Si preparava la *Working Solution* costituita da Qubit dsDNA HS buffer in cui era diluito 1:200 il fluorocromo (Qubit dsDNA HS reagent). Quindi 3µl di DNA purificato (1:10) venivano aggiunti a 197µl di *Working Solution*. Dopo incubazione (2 minuti a temperatura ambiente) veniva determinata la concentrazione di DNA del campione, utilizzando la funzione QUANT IT ds DNA, HS sul fluorimetro Qubit.

Gli amplificati con dimensioni < 1 kb sono stati sequenziati presso il Servizio di Virologia del Dipartimento mediante il metodo Sanger utilizzando l'apparecchiatura *ABI Prism* (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California) con terminatori marcati. Gli amplificati di maggiori dimensioni (> 1 kb), come quelli ottenibili dagli esperimenti di *PCR mapping*, sono stati sequenziati utilizzando il servizio offerto dalla ditta GATC Biotech (Colonia, Germania). Tutte le sequenze ottenute sono state analizzate mediante i programmi Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

2.9 Tipizzazione

La tipizzazione molecolare dei ceppi è stata effettuata mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), determinazione del sierotipo capsulare e delle proteine di superficie: *Alpha-protein*.

2.9.1 PFGE

La tecnica è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Ripa *et al* (Ripa *et al.*, 2001). In breve, le colture *overnight* sono state diluite in modo che il contenuto di DNA fosse approssimativamente di 10 µg/ml. A questo punto 1 ml della sospensione veniva centrifugato e lavato con 0,5 ml di TEN (Tris EDTA NaCl) Buffer. Il pellet risospeso in 0,5 ml di TEN Buffer era mescolato con un volume identico di *low-melting-point agarose* (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1,6% e introdotto in appositi stampi (*plug-mold*) per la creazione delle *plugs*. Una volta solidificate, le *plugs* venivano incubate per 24 ore a 37°C in 5 ml di tampone di lisi contenente lisozima (1 mg/ml) e RNasi A (50 µg/ml). Seguiva un'incubazione di 48h a 50°C in 3 ml di *Digestion Buffer* contenente proteinasi K (0,5 µg/ml). A questo punto le *plugs* subivano una serie di lavaggi in 10 ml di *TE (Tris EDTA) Buffer*. Metà plug era quindi digerita *overnight*, con 30 U di *SmaI* (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. La digestione veniva bloccata aggiungendo 1 ml di EDTA 0,5 M.

Ciascuna plug veniva posta poi su un pettine e inclusa all'interno di un gel di *Pulsed Field Certified Agarose* (Bio-Rad) all'1%. Le corse elettroforetiche, in *TBE (Tris Borato EDTA) Buffer*, sono state effettuate tramite l'apparecchiatura *Chef Mapper XA System* (Biorad) con le seguenti condizioni: tempo 22 ore, campo 6 V/cm, *initial switch time* 5 secondi, *final switch time* 35 secondi, *ramping factor* lineare. Il gel era infine colorato mediante bromuro d'etidio

(0,5 µg/ml) e visualizzato al transilluminatore. La dimensione delle bande ottenute e la qualità della corsa veniva controllata utilizzando dei campioni standard come il Lambda PFG Ladder (range 48,5 – 727,5 kb, New England Biolabs, Ipswich, USA). Una volta acquisita l'immagine digitale, i profili di restrizione ottenuti sono stati analizzati mediante criteri di letteratura (Tenover *et al.*, 1995) per evidenziare la relazione genetica tra i ceppi. I profili di restrizione SmaI sono stati utilizzati per la costruzione di una matrice di similarità in cui ciascuna banda è stata trattata come un ipotetico *locus* separato e registrata come presente (1) o assente (0) in ciascuno dei genomi in esame. Dalla matrice di similarità, usando il programma TREECONW (Yves Van de Peer, University of Konstanz), è stato ricavato il dendrogramma, che visualizzava le correlazioni genetiche esistenti tra i diversi ceppi di *S. agalactiae*. Le analisi di cluster erano basate sull'algoritmo UPGMA (Underweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

2.9.2 MLST

L' MLST è lo strumento più affidabile per la tipizzazione dei ceppi, permettendo di comparare profili genetici di differenti ceppi isolati in diverse aree geografiche in maniera inequivocabile. La tecnica permette di assegnare un *sequence type* (ST) ai vari isolati batterici sulla base della sequenza allelica di 7 geni *housekeeping*. Per i ceppi di *S. agalactiae* i ST sono stati individuati amplificando e sequenziando geni *housekeeping* secondo il protocollo suggerito da Jones *et al* (Jones *et al.*, 2003). I primers utilizzati, le condizioni di PCR e il software per l'analisi degli alleli sono accessibili su <http://pubmlst.org/agalactiae>.

2.9.3 Determinazione del sierotipo capsulare

La tipizzazione capsulare dei ceppi di *S. agalactiae* veniva eseguita mediante multiplex PCR utilizzando i primer descritti da Imperi *et al.* (Imperi *et al.*, 2010) che consentono di discriminare i dieci sierotipi capsulari fino ad oggi conosciuti. In Tabella 4 sono riportate le coppie di primer utilizzate negli esperimenti di PCR; la Tabella 5 mostra il numero e la dimensione degli amplificati che caratterizzano tutti i differenti tipi capsulari, visibili dopo elettroforesi in gel d'agarosio.

Tabella 4. Primer utilizzati negli esperimenti di tipizzazione capsulare dei ceppi di *S. agalactiae*.

<i>Gene amplificato</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenza (5'-3')</i>	<i>Bibliografia</i>
<i>cpsI</i>	CpsI-Ia-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsI-6-R	CAATTCTGTCTGGACTATCCTGATG	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsI-7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsL</i>	CpsL-F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsL-R	TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsG</i>	CpsG-F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsG-R	ATGCTCTCCAAACTGTTCTTGT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsN</i>	CpsG-2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsN-5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsN-5-R	CTCTTCACTCTTAGTGAGGTAT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsJ</i>	CpsJ-8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsJ-8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsJ-2-4-F	CATTTATTGATTGACGATTACATTGA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsI</i>	CpsJ-2-R	CCTCTTTCTCTAAAATATTCCAACC	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsJ-4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsI-7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG	Imperi <i>et al.</i> , 2010
<i>cpsJ</i>	CpsI-9-R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCATT	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsJ-Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTTCAGTTG	Imperi <i>et al.</i> , 2010
	CpsJ-Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG	Imperi <i>et al.</i> , 2010

Tabella 5. Dimensioni molecolari (bp) dei diversi prodotti di amplificazione attesi per ciascun sierotipo.

Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL) 621 bp (cpsI)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)	688 bp (cpsL)
		465 bp (cpsI)		538 bp (cpsI)	582 bp (cpsN)	470 bp (cpsI)		438 bp (cpsI)	
			352 bp (cpsG)			352 bp (cpsG)			
272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG)	272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG)		272 bp (cpsG) 229 bp (cpsI)
							179 bp (cpsI)		

2.9.4 Determinazione delle proteine di superficie: *Alpha-protein*

L'identificazione delle proteine di superficie veniva effettuata mediante multiplex PCR utilizzando i primer descritti da Creti *et al.* (Creti *et al.*, 2004) che permettono di discriminare, in base al prodotto di amplificazione ottenuto, le sei varianti alleliche dei geni codificanti le principali proteine di superficie note al momento: *alphaC*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4* e *epsilon*. In Tabella 6 sono riportate le coppie di primer utilizzate negli esperimenti di PCR.

Tabella 6. Primer utilizzati per la determinazione delle proteine di superficie di *S. agalactiae*.

Primer	Sequenza (5'-3')	Bibliografia
Universal Forward	TGATACTTCACAGACGAAACAACG	Creti <i>et al.</i> , 2004
Alpha-C Reverse	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC	Creti <i>et al.</i> , 2004
Rib Reverse	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA	Creti <i>et al.</i> , 2004
Epsilon Reverse	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG	Creti <i>et al.</i> , 2004
Alp2/Alp3 Reverse	CACTCGGATTACTATAATATTTAGCAC	Creti <i>et al.</i> , 2004
Alp4 Reverse	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC	Creti <i>et al.</i> , 2004

2.10 Southern blotting ed ibridazione

I frammenti di macrorestrizione ottenuti mediante Smal-PFGE venivano trasferiti su una membrana di nylon (*Zeta-Probe*; Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.) mediante la tecnica del trasferimento capillare.

Il gel depurinato e denaturato era messo a contatto con la membrana di nylon per una notte. Una volta completato il trasferimento, il DNA veniva fissato alla membrana mediante irradiazione con raggi UV. La membrana era quindi pre-ibridata per 2 ore a 55°C nel tampone *Ultra-hyb* (*Ultrasensitive Hybridization Buffer*) (Applied Biosystems, Foster City, USA). Le ibridazioni sono state effettuate nelle stesse condizioni *overnight* in presenza della sonda marcata con biotina precedentemente denaturata a 100°C per 10 minuti.

Le sonde utilizzate negli esperimenti di ibridazione, sono state ottenute mediante PCR impiegando coppie di primer specifiche e il DNA di ceppi noti. Gli amplificati venivano purificati direttamente dalla miscela di reazione (vedi paragrafo 2.8) e poi marcati con biotina utilizzando il kit *Psoralen-Biotin BrightStar* (Ambion, ThermoFisher Scientific).

Dopo l'ibridazione la membrana veniva sottoposta ad una serie di lavaggi di 15 minuti circa, con soluzioni a forza ionica decrescente di SSC (*saline-sodio citrato*) *Buffer* e SDS (*sodio dodecil-solfato*) per rimuovere la sonda in eccesso. Una volta conclusi i lavaggi veniva effettuata la rilevazione del segnale conformemente a quanto indicato nel kit di marcatura; l'aggiunta di streptavidina genera, in combinazione con la biotina, un segnale luminoso rilevabile sulla lastra fotografica dopo un minuto di esposizione.

2.11 Coniugazione

Gli esperimenti di coniugazione sono stati condotti *in vitro* utilizzando come donatori diversi ceppi di *S. agalactiae* e come riceventi i ceppi *S. agalactiae* 1357RF e *S. pyogenes* 12RF. Nei saggi di trasferibilità i ceppi donatori e riceventi erano fatti crescere in BHI brodo fino ad una OD₆₇₅ di 0,4, erano filtrati attraverso filtri di nitrocellulosa da 0,45 µm (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Il filtro veniva posizionato sterilmente al centro di una piastra di agar sangue e incubato a 37°C *overnight* in atmosfera controllata (5% di CO₂). Successivamente il filtro era lavato con 10 ml di soluzione fisiologica sterile in modo da rimuovere i batteri dalla sua superficie. Seguiva una centrifugazione a 8000 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto era quindi risospeso in 1 ml di soluzione fisiologica. Da questa soluzione venivano effettuate delle diluizioni scalari fino a raggiungere la diluizione di 10⁻⁷. 10 µl delle diluizioni 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ venivano inoculati su piastre selettive di agar sangue per la conta delle CFU/ml di donatori e riceventi. Per la selezione dei transconiuganti, tutto l'intero veniva spatolato su piastre di agar sangue contenenti opportuni antibiotici alla concentrazione adeguata. Dopo 24-48 ore di incubazione a 37°C si procedeva alla conta delle colonie per determinare le frequenze di trasferimento, sia in funzione del donatore che del ricevente.

3. RISULTATI

Una collezione di 368 ceppi GBS, isolati nel periodo 2010-2016, precedentemente caratterizzati per la resistenza a macrolidi, lincosamidi e tetraciclina, è stata sottoposta ad un'analisi retrospettiva per saggiare la resistenza ai chinoloni e al cloramfenicolo. Lo screening ha evidenziato 11 ceppi resistenti ai chinoloni (2,99%) e 6 resistenti al cloramfenicolo (1,6%), dei quali 4 erano anche resistenti ai fluorochinoloni. Di seguito, i risultati dettagliati.

3.1 Caratterizzazione dei ceppi di *S. agalactiae* resistenti ai fluorochinoloni

3.1.1 Determinazione dei profili di sensibilità

La resistenza ai fluorochinoloni è stata inizialmente investigata utilizzando il test di screening con la norfloxacin, secondo le indicazioni EUCAST (www.eucast.org), e poi valutando la minima concentrazione inibente per la levofloxacin. Tutti i ceppi che avevano un diametro inferiore a 12 mm e/o presentavano MIC > 2 µg/ml sono stati selezionati per lo studio e successivamente testati per le seguenti molecole chinoloniche: ciprofloxacina, ofloxacina, ulifloxacina, trovafloxacina, moxifloxacina, sparfloxacina.

Lo screening ha evidenziato 11 ceppi resistenti (2,99%), provenienti da diversi ospedali della Regione Marche, 9 isolati da donne e 2 da uomini; 6 erano stati isolati durante il periodo 2010-2015 e 5 nel 2016. In tabella 7 sono riassunti i dati di isolamento degli 11 ceppi di *S. agalactiae* resistenti alla levofloxacin.

Tabella 7. Principali dati di isolamento degli 11 ceppi di *S. agalactiae* resistenti alla levofloxacin.

<i>Isolato</i>	<i>Ospedale</i>	<i>Mese/anno</i>	<i>Origine</i>	<i>Sesso/età</i>
Sag545	H1	Settembre 2010	Emocoltura	Femmina-82
Sag107	H2	Febbraio 2011	Tampone vaginale	Femmina-34
Sag442	H1	Marzo 2012	Emocoltura	Femmina-61
Sag139	H2	Novembre 2012	Urine	Maschio-55
Sag236	H2	Gennaio 2014	Urine	Femmina-42
Sag403	H3	Marzo 2015	Fistola sacrale	Maschio-31
Sag162	H1	Maggio 2016	Tampone vaginale	Femmina-74
Sag225	H1	Maggio 2016	Broncoaspirato	Femmina-62
Sag690	H1	Agosto 2016	Tampone vaginale	Femmina-25
Sag783	H1	Settembre 2016	Lochi	Femmina-21
Sag328	H1	Ottobre 2016	Tampone vaginale	Femmina-26

CHL, cloramfenicolo; ERY, erytromicina; TET, tetraciclina; H1, Ancona Torrette; H2, Jesi; H3, Fano.

I saggi di MIC evidenziavano che tutti i ceppi, eccetto uno (Sag139), erano resistenti ad alto livello alla levofloxacin (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) e resistenti a tutti gli altri fluorochinoloni (MIC range, 4-64 $\mu\text{g/ml}$). Sag139 aveva un basso livello di resistenza alla levofloxacin con un valore di MIC, 4 $\mu\text{g/ml}$ che, a seconda dei *breakpoints* dei due comitati di riferimento, poteva essere interpretato come intermedio (CLSI) o come resistente (EUCAST). Inoltre, esso era resistente alla norfloxacin,

non sensibile a ciprofloxacina ed ofloxacina e sensibile a trovafloxacina, moxifloxacina, sparfloxacina ed ulifloxacina (Tabella 1 e Tabella 8).

Come accennato nell'introduzione, sebbene sia un meccanismo meno importante rispetto alle mutazioni del target, la resistenza ai chinoloni può essere dovuta a meccanismi di efflusso attivo. Questo meccanismo è già stato evidenziato in *S. aureus* e in *S. pneumoniae*, che producono rispettivamente le pompe di efflusso NorA e PmrA (Hooper *et al.*, 2002), mentre rimane ancora poco studiato in altri batteri Gram-positivi.

Pertanto, abbiamo voluto verificare la presenza di pompe di efflusso nei ceppi in esame, valutando i valori di MIC di norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina ed ulifloxacina in presenza ed assenza dell'inibitore reserpina (10 µg/ml).

Dal momento che non abbiamo osservato nessuna riduzione dei valori di MIC ottenuti, come riportato nelle specifiche colonne (NOR+R; LEV+R; CIP+R; ULI+R) in Tabella 8, è stato escluso il coinvolgimento dei sistemi di efflusso nella resistenza ai chinoloni.

Tabella 8. Valori di MIC ai fluorochinoloni degli 11 ceppi di *S. agalactiae* resistenti alla levofloxacin.

<i>Isolati</i>	<i>MIC (μg/ml)</i>											
<i>LEVO-R</i>	<i>NORF</i>	<i>OFLO</i>	<i>CIP</i>	<i>LEVO</i>	<i>SPAR</i>	<i>TROVA</i>	<i>MOXI</i>	<i>ULI</i>	<i>NOR+R</i>	<i>CIP+R</i>	<i>LEVO+R</i>	<i>ULI+R</i>
Sag545	64	64	32	32	64	16	4	16	64	32	32	16
Sag107	64	64	32	64	64	16	4	16	64	32	64	16
Sag442	64	64	32	64	64	16	4	16	64	>32	64	16
Sag139	32	4	4	4	2	0.5	0.5	2	32	8	4	2
Sag236	64	64	32	32	64	8	4	16	64	>32	32	16
Sag403	64	64	32	32	32	8	4	16	64	32	32	16
Sag162	64	64	32	32	64	16	4	16	64	>32	32	16
Sag225	64	64	32	32	32	8	4	16	64	>32	32	16
Sag690	64	64	32	32	32	8	4	16	64	>32	32	16
Sag783	64	64	32	32	32	16	4	16	64	32	32	16
Sag328	64	64	32	32	32	8	4	16	64	32	32	16

NORF, norfloxacin; OFLO, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin; LEVO, levofloxacin; SPAR, sparfloxacin; TROVA, trovafloxacin; MOXI, moxifloxacin; ULI, ulifloxacin; NOR+R, CIP+R, LEVO+R e ULI+R indicano la presenza della reserpina come inibitore delle pompe di efflusso.

3.1.2 Determinazione dei determinanti di resistenza

Come già riportato, la resistenza ad altri farmaci non chinolonici, come macrolidi, lincosamidi e tetraciclina, era già stata valutata in studi precedenti ed erano pertanto noti i principali determinanti genetici coinvolti. Nell'ambito degli 11 ceppi fluorochinoloni-resistenti, 4 erano sensibili a tutti gli antibiotici non chinolonici considerati, e, in linea con questo risultato, non possedevano determinanti di resistenza. 1 isolato era unicamente resistente alla tetraciclina per la presenza del gene *tet(M)*; 6 isolati erano resistenti alla tetraciclina ed agli antibiotici MLS, 2 ceppi avevano un fenotipo cMLS, uno dei quali positivo per *erm(B)* e l'altro per *erm(TR)*, infine 4 avevano il gene *erm(TR)* e presentavano un fenotipo iMLS. Le informazioni relative al fenotipo ed il genotipo di resistenza sono riportate nella Tabella 9.

Tabella 9. Principali dati di caratterizzazione fenotipica e genotipica degli 11 ceppi di *S. agalactiae* fluorochinoloni-resistenti.

<i>Isolati</i>	<i>MIC (μg/ml)</i>			<i>Fenotipo MLS</i>	<i>Genotipo</i>	
	<i>ERY</i>	<i>CLI</i>	<i>TET</i>		<i>erm</i>	<i>tet</i>
Sag545	0.25	0.25	0.5	—	—	—
Sag107	0.12	0.25	0.5	—	—	—
Sag442	0.12	0.12	0.5	—	—	—
Sag139	0.25	0.25	32	—	—	<i>tet</i> (M)
Sag236	4	0.25	64	iMLS	<i>erm</i> (TR)	<i>tet</i> (M)
Sag403	4	0.25	64	iMLS	<i>erm</i> (TR)	<i>tet</i> (M)
Sag162	0.12	0.12	0.5	—	—	—
Sag225	4	0.25	32	iMLS	<i>erm</i> (TR)	<i>tet</i> (M)
Sag690	128	128	32	cMLS	<i>erm</i> (B)	<i>tet</i> (M)
Sag783	2	0.25	16	cMLS	<i>erm</i> (TR)	<i>tet</i> (M)
Sag328	2	0.12	32	iMLS	<i>erm</i> (TR)	<i>tet</i> (M)

3.1.3 Tipizzazione dei ceppi di *S. agalactiae* fluorochinoloni-resistenti

Al fine di stabilire le possibili relazioni genetiche esistenti tra gli 11 ceppi di *S. agalactiae*, essi sono stati tipizzati a livello molecolare mediante Smal-PFGE, MLST, determinazione del sierotipo capsulare e delle Alpha-proteine.

3.1.3.1 Smal-PFGE

L'analisi di restrizione con l'enzima Smal, seguita da elettroforesi in campo pulsato (Smal-PFGE) ha permesso di delineare il grado di correlazione genetica tra gli 11 ceppi di *S. agalactiae* in esame e di costruire un dendrogramma (Figure 12 e 13).

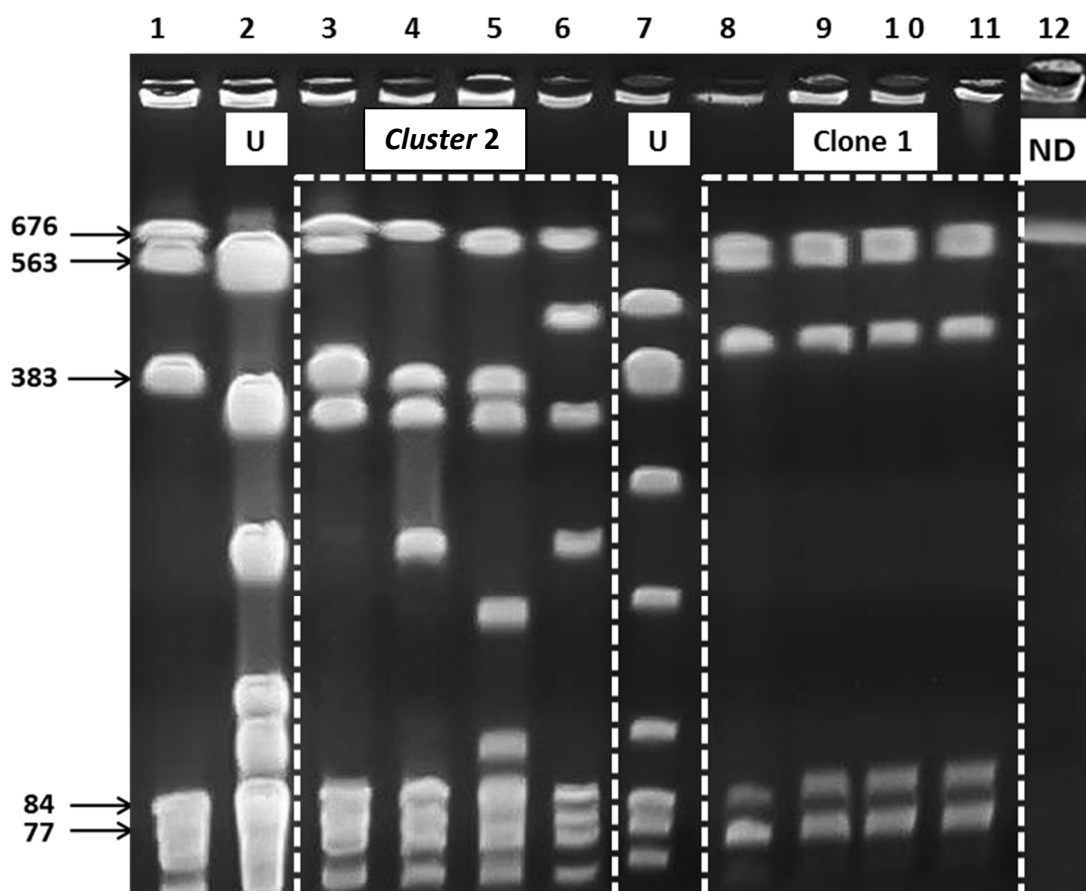


Figura 12. Restrizione con SmaI mediante elettroforesi in campo pulsato dei ceppi in esame. Dalla posizione 1 alla 12, rispettivamente: ATCC 2603 V/R, Sag236, Sag403, Sag225, Sag690, Sag328, Sag783, Sag442, Sag162, Sag107, Sag545, Sag139. I riquadri nell'immagine servono ad indicare i cloni individuati. U: profilo unico, nd: non digerito.

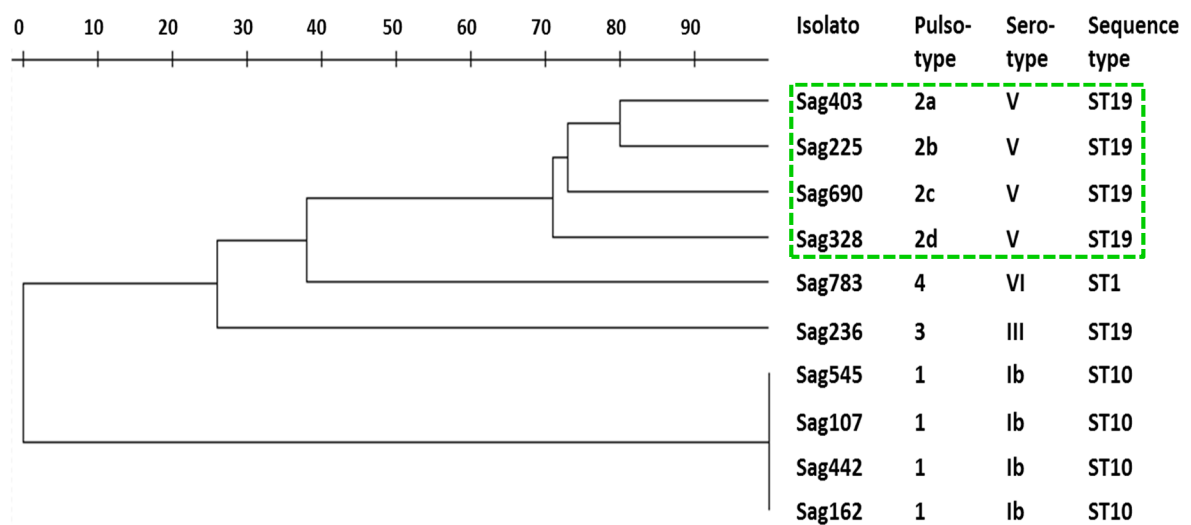


Figura 13. Dendrogramma degli 11 ceppi di *S. agalactiae* resistenti ai fluorochinoloni. I ceppi all'interno del rettangolo verde sono quelli appartenenti al *cluster 2*.

Dai pattern ottenuti con la SmaI-PFGE è stato possibile evidenziare la presenza di un clone principale: il clone 1 che comprendeva quattro ceppi con profilo di restrizione identico (linee 8-11), costituito da cinque bande, delle dimensioni comprese tra 600 e 70 bp (Figura 12); e un *cluster*, 2, che comprendeva quattro ceppi (linee 3-6) con profili di restrizione che differivano per due o tre bande e pertanto, in base ai criteri di Tenover, erano considerati ceppi correlati. Anche dall'analisi del dendrogramma i 4 ceppi risultavano essere correlati, avendo una similarità compresa tra il 70-80%. Infine, i profili dei ceppi Sag236 e Sag783 (linee 2 e 7) risultavano

completamente differenti da tutti gli altri, con una similarità < 50%. Il ceppo Sag139 (linea 12) non risultava digeribile con l'enzima SmaI.

3.1.3.2 Determinazione molecolare del tipo capsulare

Poiché la capsula rappresenta il principale fattore di virulenza di *S. agalactiae* abbiamo proceduto alla distinzione del tipo di polisaccaride capsulare espresso dai ceppi della collezione presa in esame. Tale analisi è stata condotta mediante multiplex PCR (Imperi *et al.*, 2010) che consente di discriminare i dieci sierotipi capsulari fino ad oggi conosciuti.

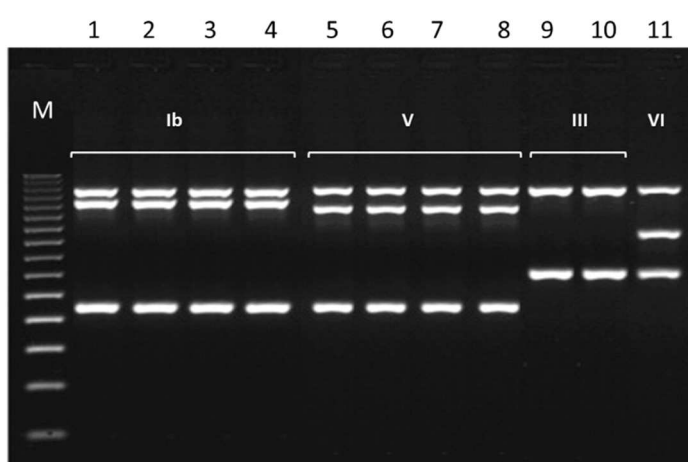


Figura 14. Determinazione del tipo capsulare mediante PCR multiplex. M, marker 50 bp. Linee 1-11: Marker 100 bp, Sag162, Sag545, Sag107, Sag442, Sag403, Sag225, Sag690, Sag328, Sag236, Sag139, Sag783.

■ Sierotipo Ib ■ Sierotipo V
■ Sierotipo III ■ Sierotipo VI

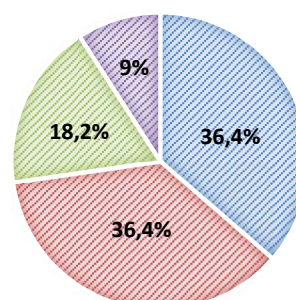


Grafico 1. Distribuzione del sierotipo capsulare negli 11 ceppi analizzati.

La tipizzazione degli 11 ceppi di *S. agalactiae*, effettuata mediante esperimenti di multiplex-PCR, ha prodotto i seguenti risultati: 4 ceppi presentavano lo stesso sierotipo capsulare Ib (Sag545, Sag107, Sag442 e Sag162), 4 ceppi il sierotipo V (Sag403, Sag225, Sag690 e Sag328), 2 ceppi il sierotipo III (Sag139 e Sag236) ed uno solo il VI (Sag783). La distribuzione in percentuale è evidenziata nel Grafico 1.

3.1.3.3 Determinazione delle proteine di superficie: *Alpha-protein*

Mediante una seconda indagine di multiplex PCR è stato possibile determinare i geni che codificano per le proteine di adesione. I risultati dell'analisi sugli 11 ceppi GBS in esame sono riportati in Figura 15. Come si può notare, 4 ceppi presentavano la proteina di superficie Alpha C (36,4%), 4 ceppi esprimevano la proteina Epsilon (36,4%) ed i restanti 3 erano positivi per la proteina Rib (27,2%). Il Grafico 2 indica la distribuzione in percentuale dei tipi di proteine di superficie.

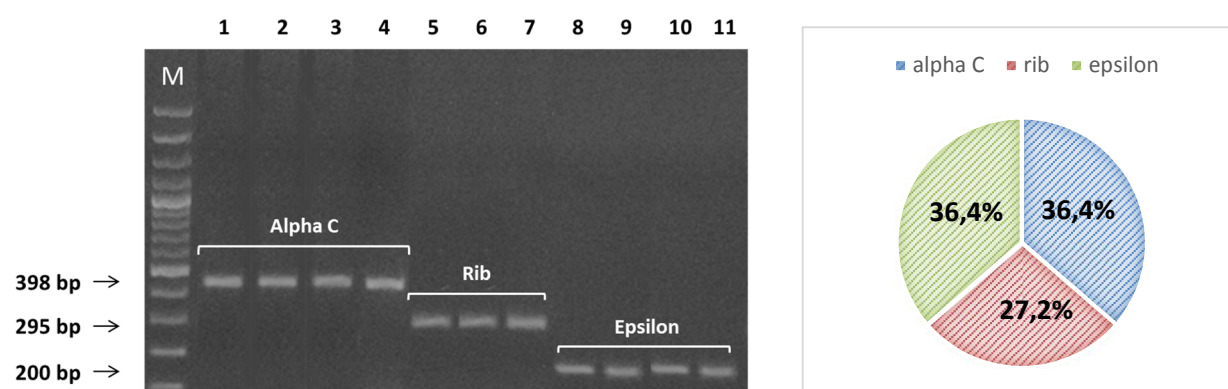


Figura 15. Determinazione delle Alpha-like-protein (Alp) mediante multiplex PCR. M, marker 100 bp. Linee 1-11: Sag545, Sag107, Sag442, Sag162, Sag139, Sag236, Sag783; Sag403, Sag225, Sag690, Sag328.

Grafico 2. Distribuzione delle Alpha-like-protein negli 11 ceppi analizzati.

Combinando insieme i risultati complessivi di tipizzazione degli 11 ceppi GBS resistenti ai fluorochinoloni, ottenuti mediante diverse procedure molecolari, si evidenziava un clone principale, che includeva 4 ceppi identici, con le stesse caratteristiche genotipiche: pulsotipo 1, capsula Ib, gene *alphaC* e ST10. I 4 GBS che dalle analisi di PFGE mostravano avere profili di restrizione correlati (Figura 12), rappresentavano un *cluster* e condividevano le seguenti caratteristiche genetiche: capsula di tipo V; gene *epsilon*, ST19. Da notare che la tipizzazione

mediante Smal-PFGE, l'analisi del tipo capsulare e dei geni *alp* (*alpha-like protein genes*) presentavano nel complesso un potere discriminante maggiore, poiché consentivano di distinguere il ceppo Sag236 (pulsotipo 3, capsula III, gene *rib*) nell'ambito dei ceppi appartenenti al ST19. La Tabella 10 riassume i risultati complessivi della tipizzazione molecolare degli 11 ceppi GBS resistenti ai fluorochinoloni.

Tabella 10. Confronto dei risultati di tipizzazione mediante analisi di PFGE, PCR multiplex per tipo capsulare e proteine di virulenza della famiglia AlpC e MLST.

<i>Isolato LEVO-R</i>	<i>Tipizzazione</i>			
	<i>Pulsotipo</i>	<i>Sierotipo capsulare</i>	<i>Alp</i>	<i>ST</i>
Sag545	1	Ib	<i>alpha C</i>	ST10
Sag107	1	Ib	<i>alpha C</i>	ST10
Sag442	1	Ib	<i>alpha C</i>	ST10
Sag139	nt	III	<i>rib</i>	ST17
Sag236	3	III	<i>rib</i>	ST19
Sag403	2a	V	<i>epsilon</i>	ST19
Sag162	1	Ib	<i>alpha C</i>	ST10
Sag225	2b	V	<i>epsilon</i>	ST19
Sag690	2c	V	<i>epsilon</i>	ST19
Sag783	4	VI	<i>rib</i>	ST1
Sag328	2d	V	<i>epsilon</i>	ST19

nt: non tipizzabile.

3.1.4 Analisi delle regioni QRDR delle subunità GyrA (DNA-girasi) e ParC (Topoisomerasi IV)

Per studiare il meccanismo molecolare della resistenza ai fluorochinoloni negli 11 ceppi di GBS, è stata eseguita un'analisi di restrizione della regione QRDR dei geni target *gyrA* e *parC*, usando l'enzima *Hin*I che taglia specificatamente la sequenza G*ANTC all'interno della regione QRDR in tutti i ceppi *wild type*. Le mutazioni più frequentemente associate alla resistenza ai chinoloni si verificano soprattutto a livello della sequenza di riconoscimento dell'enzima, comportando la perdita del sito *Hin*I a livello dei codoni Ser81 (*GyrA*) e Ser79 (*ParC*). I due prodotti di amplificazione, 616 bp per *gyrA* e 495 bp per *parC*, ottenuti mediante primer di letteratura (Biedenbach *et al.*, 2006), erano digeriti mediante *Hin*I e analizzati dopo elettroforesi in gel d'agarosio al 2%. In tutti gli esperimenti erano inclusi sia il DNA genomico estratto da *S. agalactiae* ATCC 2603V/R (ceppo *wild type*), che altri isolati clinici sensibili ai fluorochinoloni.

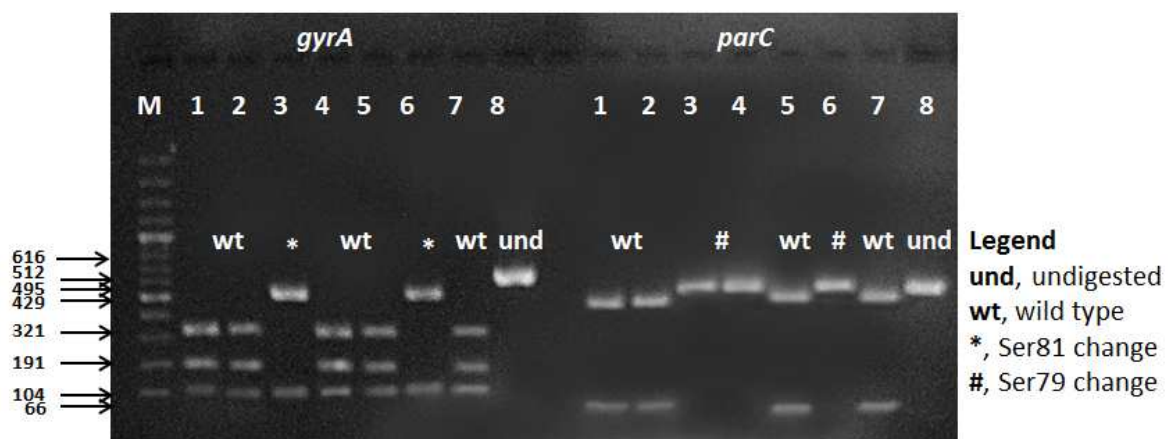


Figura 16. Analisi di restrizione degli amplificati dei geni *gyrA* e *parC*, digeriti con *Hin*I. M, marker 100 bp Plus; linee 1-8: ATCC 2603 V/R, GBS wt, Sag107, Sag139, GBS wt, Sag162, GBS wt, amplificato non digerito di 2603V/R. I ceppi mutati in *gyrA* e *parC* sono visibili alle linee 3 (Sag107) e 6 (Sag162), mentre, Sag139 (linea 4) è mutato solo in *parC*.

Come si può vedere in Figura 16, per il prodotto di *gyrA*, la digestione con HinfI produceva tre frammenti (321- 191- 104 bp) nei ceppi *wild type*, mentre nei ceppi mutati la perdita di uno dei due siti HinfI generava due frammenti di restrizione di 512-104 bp. L'amplificato di *parC* presentava 1 solo sito HinfI nei ceppi *wild type* e la formazione di due prodotti di digestione: 429-66 bp. La perdita del sito HinfI nei ceppi mutati, produceva una banda con dimensioni equivalenti a quelle del campione non digerito, utilizzato come controllo della reazione di restrizione.

Dall'analisi di restrizione con HinfI si evince che 10 ceppi presentavano mutazioni nei geni *gyrA* e *parC* che codificano rispettivamente per i due target enzimatici DNA girasi e topoisomerasi IV. I ceppi in questione hanno una mutazione puntiforme a livello del codone codificante un residuo di Serina in posizione 81 del gene *gyrA* e della Serina in posizione 79 del gene *parC*. L'unico ceppo con resistenza di basso livello alla levofloxacina (MIC, 4 µg/ml) presentava una mutazione puntiforme (Ser79) solo in *parC*.

Entrambi gli amplificati dei geni *gyrA* e *parC* sono stati sequenziati in tutti i ceppi in analisi, per (i) confermare le mutazioni evidenziate dall'analisi di restrizione, (ii) definire con precisione la sequenza aminoacidica dedotta a livello dei codoni Ser81 e Ser79 e, infine, (iii) rilevare eventuali mutazioni addizionali sia in prossimità del sito HinfI sia nelle regioni fiancheggianti la QRDR. I dati raccolti sono riassunti nella Tabella 11.

Tabella 11. Risultati di sequenza ed analisi molecolare delle subunità GyrA (DNA girasi) e ParC (Topoisomerasi IV).

<i>Isolati</i>	<i>Cambiamenti aminoacidici</i>		<i>Altre mutazioni silenziose in ParC</i>
	<i>GyrA</i>	<i>ParC</i>	
Sag545	Ser81Leu	Ser79Phe	Ile81 (ATC/ATT); Pro160 (CCC/CCT); Leu183 (CTA/TTA)
Sag107	Ser81Leu	Ser79Phe	Ile81 (ATC/ATT); Pro160 (CCC/CCT); Leu183 (CTA/TTA)
Sag442	Ser81Leu	Ser79Phe	Ile81 (ATC/ATT); Pro160 (CCC/CCT); Leu183 (CTA/TTA)
Sag139	wt	Ser79Phe	Ala114 (GCG/GCA); Pro160 (CCC/CCT); Leu183 (CTA/TTA)
Sag236	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)
Sag403	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)
Sag162	Ser81Leu	Ser79Phe	Ile81 (ATC/ATT); Pro160 (CCC/CCT); Leu183 (CTA/TTA)
Sag225	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)
Sag690	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)
Sag783	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)
Sag328	Ser81Leu	Ser79Phe	Ala142 (GCG/GCA); Leu183 (CTA/TTA); His196 (CAC/CAT)

Le analisi di sequenza confermavano le mutazioni puntiformi nelle rispettive QRDR evidenziate con l'analisi HinfI-RFLP. Utilizzando il genoma di *S. agalactiae* ATCC 2603 V/R come riferimento *wt* (accession no. AE009948), tutti i 10 ceppi con alto livello di resistenza avevano le medesime mutazioni Ser81Leu per GyrA e Ser79Phe per ParC.

Questa combinazione è effettivamente una delle più frequenti identificate nei ceppi di *S. agalactiae* resistenti ai fluorochinoloni (Kawamura *et al.*, 2003; Wehbeh *et al.*, 2005; Biedenbach *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2015).

A differenza di *gyrA*, per cui non sono state evidenziate altre mutazioni al di fuori di quella classica Ser81Leu, in tutti i ceppi analizzati erano presenti diverse mutazioni supplementari in *parC*, una delle quali (Ile81) si trova in prossimità del sito HinfI della QRDR. Tutte queste mutazioni

puntiformi non comportano modificazioni della sequenza amminoacidica e non contribuiscono alla resistenza ai chinoloni. Tuttavia, il tipo e la combinazione di queste mutazioni hanno prodotto informazioni utili ai fini della tipizzazione dei ceppi, consentendo, ancora una volta, di evidenziare delle differenze clonali, soprattutto nell'ambito dei ceppi con ST19. Infatti, i quattro genomi identici del clone principale con pulsotipo 1 (ST10, Ib, *alphaC*) (Tabella 10) presentavano lo stesso tipo di mutazioni in *parC* (Ile81, Pro160, Leu183); allo stesso modo, i quattro ceppi correlati del *cluster* 2 (ST19, pulsotipi 2a-2d) condividevano lo stesso pattern di mutazioni (Ala142, Leu183, His196); la differente combinazione evidenziata in Sag139 (Ala114, Pro160, Leu183) rendeva il ceppo chiaramente distinguibile rispetto a tutti gli altri, anche per quanto riguarda le mutazioni in *parC*.

3.2 Caratterizzazione dei ceppi di *S. agalactiae* resistenti al cloramfenicolo

3.2.1 Principali caratteristiche dei ceppi di *S. agalactiae* cloramfenicolo-resistenti

Mediante test di diffusione in agar, l'intera collezione di 368 GBS è stata selezionata per la resistenza al cloramfenicolo. 6 ceppi sono risultati resistenti (1,6%), 4 dei quali erano anche resistenti a tutti i fluorochinoloni testati.

Una prima indagine molecolare ha permesso di evidenziare che la resistenza era conferita dal gene *catQ* in 3 isolati (Sag236, Sag403 e Sag225) e dal gene *catp*_{C194} in 1 isolato (Sag690). I rimanenti due ceppi cloramfenicolo-resistenti erano sensibili a tutti gli altri antibiotici e non possedevano nessuno dei determinanti *cat* (*catp*_{C194}, *catp*_{C221}, *catp*_{C223} e *catQ*) tradizionalmente associati con il fenotipo di resistenza al cloramfenicolo; inoltre erano negativi anche per altri determinanti (geni *fex*, *cfr*) coinvolti in fenotipi di cross-resistenza ai fenicoli (Brenciani *et al.*, 2016).

Il determinante genetico *catQ*, originariamente descritto in *S. pneumoniae* (Mingoia *et al.*, 2007) e successivamente in altre specie di *Streptococcus* non emolitiche (Brenciani *et al.*, 2014; Chaffanel *et al.*, 2015), non era ancora mai stato descritto nella specie *S. agalactiae*. Per questo, la dimostrazione del gene *catQ* in tre isolati GBS non duplicati, ottenuti da materiali clinici diversi e provenienti da ospedali diversi ha spinto ad uno studio dettagliato sull'elemento genetico coinvolto.

Poiché negli streptococchi è stato riportato che il gene *catQ* è costantemente associato con un gene *mef(I)* in un elemento genetico indicato *IQ element* (Mingoia *et al.*, 2015), la presenza di

una pompa di efflusso ai macrolidi poteva essere fenotipicamente mascherata dalla metilasi codificata dal gene *erm*(TR), che conferisce un fenotipo di resistenza inducibile alla clindamicina (iMLS) (Figura 17).



Figura 17. Fenotipo inducibile iMLS, ottenuto utilizzando un dischetto di eritromicina (15 µg/ml) e uno di clindamicina (2 µg/ml).

La ricerca del gene *mef* è stata effettuata nei 3 ceppi GBS mediante amplificazione e sequenziamento. Tutti i tre isolati erano positivi per il gene *mef*(I) la cui sequenza evidenziava un'identità del 99% con il corrispondente gene prototipo (Mingoia *et al.*, 2007). Come mostrato dall'analisi di tipizzazione precedentemente riportata (Figura 13), tutti e tre i ceppi possedevano lo stesso *sequence type* (ST19); Sag236 si differenziava per il tipo capsulare (III) e per il profilo di SmaI-PFGE, mentre gli altri due condividevano il tipo capsulare (V) e la proteina di superficie (epsilon) ed erano strettamente correlati tra loro.

Per quanto riguarda la resistenza ad altri antibiotici, oltre alla resistenza al cloramfenicolo (MIC, 32 µg/ml), tutti e tre i ceppi erano resistenti alla tetraciclina (MIC, 64 µg/ml), conferita dal gene *tet*(M). Il valore di MIC, 4 µg/ml all'eritromicina, lievemente superiore ai valori di MIC precedentemente riportati per altri ceppi GBS *erm*(TR)-positivi (Mingoia *et al.*, 2016) era presumibilmente determinato dalla contemporanea presenza di *mef*(I). La Tabella 12 riporta le caratteristiche cliniche, fenotipiche e genetiche dei 3 ceppi.

Tabella 12. Principali caratteristiche dei ceppi di *S. agalactiae* cloramfenicolo-resistenti Sag236, Sag403 e Sag225.

Isolato (anno)	Tipizzazione				MIC (mg/L)			Geni di resistenza							
	ST	Tipo capsulare	Alp	Pulsotipo	CHL	ERY	TET	catQ	cat _{pC194}	cat _{pC221}	erm(TR)	erm(T)	mef(I)	tet(M)	tet(O)
<i>S. agalactiae</i> Sag236 (2014)	19	III	rib	3	32	4	64	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>S. agalactiae</i> Sag403 (2015)	19	V	epsilon	2a	32	4	64	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>S. agalactiae</i> Sag225 (2016)	19	V	epsilon	2b	32	4	32	+	-	-	+	-	+	+	-

CHL, cloramfenicolo; ERY, erytromicina; TET, tetraciclina.

3.2.2 Caratterizzazione del modulo IQ

Una volta confermata l'associazione tra i due geni *catQ* e *mef(I)*, che indicava la presenza di un modulo IQ-like in tutti e tre gli isolati, abbiamo proceduto alla caratterizzazione mediante *PCR mapping* per effettuare un primo confronto con il modulo descritto in *S. pneumoniae* 529.

Come ampiamente descritto per tutti i moduli IQ finora studiati (Mingoia *et al.*, 2015) il gene *mef(I)* era situato a monte del gene *catQ*. Le dimensioni molecolari (~5,8 kb) e l'analisi di restrizione con HindIII ed EcoRV (Brenciani *et al.*, 2014) confermavano che il frammento che si estende da *mef(I)* a *catQ* era conservato come quello di tutti gli altri moduli IQ riportati in letteratura ad oggi.

Le regioni a monte di *mef(I)* ed a valle di *catQ* sono state studiate mediante mappatura PCR e sequenziamento: in tutti gli isolati, il modulo IQ corrispondeva a quello del prototipo di *S. pneumoniae*, fatta eccezione per l'assenza del gene della trasposasi *tnp1* a monte di *mef(I)*. Complessivamente, l'identità nucleotidica con il modulo IQ di *S. pneumoniae* era del 99% (Figura 18).

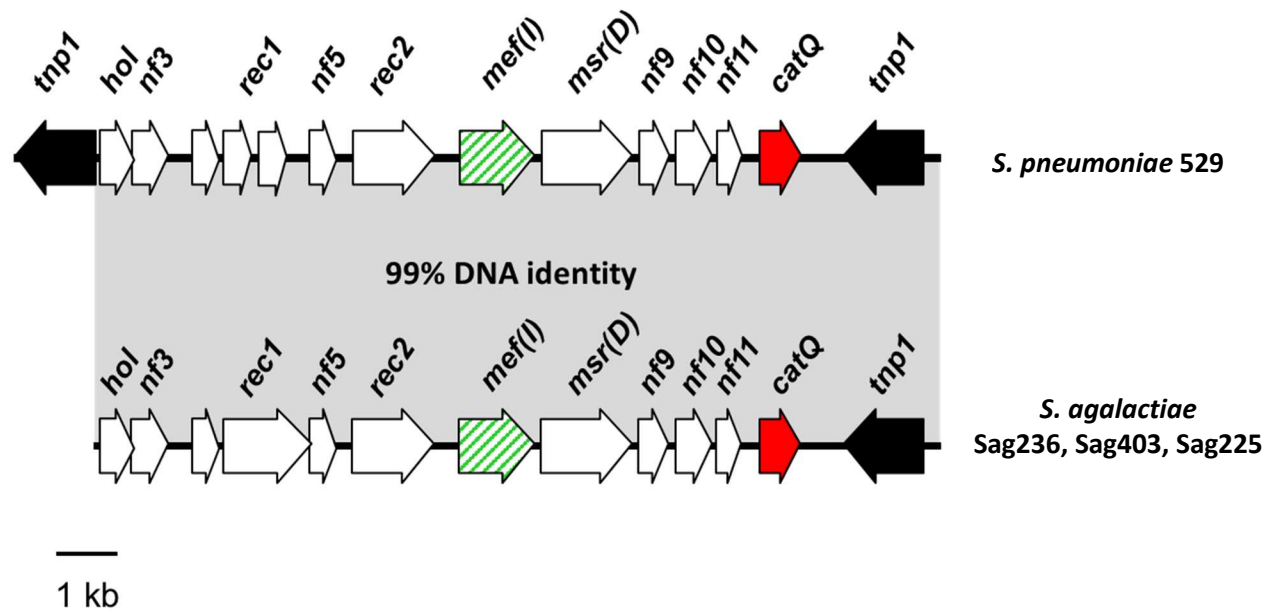


Figura 18. Illustrazione schematica del modulo IQ di *S. agalactiae* Sag236, Sag403 e Sag225 rispetto al modulo prototipo IQ di *S. pneumoniae* 529 (numero di accesso HG965092).

3.2.3 Caratterizzazione del contesto genetico del modulo IQ

Il contesto genetico del modulo IQ di *S. agalactiae* Sag236, Sag403 e Sag225 è stato determinato mediante nuove indagini di *PCR mapping*, tenendo conto che i moduli IQ rilevati sia nel prototipo *S. pneumoniae* 529 che in due diversi ceppi di *S. pyogenes* (029 e 005) sono inseriti in ICE appartenenti alla famiglia Tn5253 (Mingoia *et al.*, 2014). Utilizzando questi elementi come riferimento sono stati ricercati i geni funzionali essenziali, in particolare è stata ricercata la presenza dei geni *int*₅₂₅₂ e *int*_{Sp23FST81}, che codificano rispettivamente per l'integrasi di Tn5252 e di ICES_{Sp23FST81} e delle regioni fiancheggianti il modulo IQ nell'ICES_{Sp529IQ} di *S. pneumoniae* (Mingoia *et al.*, 2014).

I 3 isolati GBS erano negativi per i geni di integrasi, ma tutti erano positivi per entrambe le regioni fiancheggianti. L'amplificato a valle di *catQ* era delle stesse dimensioni (~6 kb) di ICES_{Sp529IQ},

mentre la regione a monte di *mef(I)* (~8 kb) era circa la metà dell'elemento di riferimento (15,1 kb) (figura 18). Il sequenziamento di queste due regioni mostrava un'identità nucleotidica del 100% nei tre isolati, confermava l'assenza di una delle due copie di *tnp1* del modulo IQ, quella a monte di *mef(I)*, ed infine dimostrava l'assenza anche del frammento di Tn916 che caratterizza l'ICE prototipo ICESpn529IQ. Ulteriori indagini di PCR hanno evidenziato la presenza di quasi tutto l'ICESpn529IQ con l'eccezione della porzione iniziale che comprende i geni *int* e *mob* (Figura 18).

3.2.4 Esperimenti di trasferibilità ed evidenza di un elemento genetico mobile che trasporta i geni *mef(I)*, *catQ* ed *erm(TR)*

Esperimenti di coniugazione batterica sono stati utilizzati per verificare la mobilità dei determinanti di resistenza *mef(I)*, *catQ* ed *erm(TR)* in tutti e tre i donatori sia a livello intra- che inter-specifico, utilizzando rispettivamente i riceventi *S. agalactiae* 1357RF e *S. pyogenes* 12RF.

Pur se con una bassa frequenza di coniugazione ($< 10^{-8}$), sono stati ottenuti transconiuganti da uno solo (Sag236) dei tre isolati GBS, con entrambi i riceventi.

Tutti i transconiuganti ottenuti sia dall'incrocio intra-specifico (Sag236 X Sag1357RF) che inter-specifico (Sag236 X Spy12RF) erano fenotipicamente resistenti al cloramfenicolo e all'eritromicina con MIC comparabili a quelle del donatore, ma erano sensibili alla tetraciclina. Le analisi genetiche, condotte con le modalità già descritte per il donatore, confermavano non solo l'acquisizione dei geni *catQ* e *mef(I)* ma anche del gene *erm(TR)*, suggerendo un legame tra i tre geni di resistenza in un unico elemento genetico mobile.

3.2.5 Localizzazione dei determinanti di resistenza

Per definire la localizzazione dei determinanti di resistenza nei transconiuganti ottenuti da ciascun tipo di incrocio il DNA genomico è stato sottoposto ad analisi RFLP mediante SmaI-PFGE (Figura 12) e successivamente sottoposto alle procedure di Southern blot e di ibridazione con la sonda *catQ*.

Nell'incrocio intra-specifico (Sag236 X Sag1357RF) l'analisi SmaI-PFGE mostrava la scomparsa di una banda di circa 400 kb, rispetto al ricevente Sag1357RF, e la comparsa di una banda più grande di 500 kb, che ibridava con la sonda *catQ* (Figura 19, A). Analogamente, nell'incrocio inter-specifico (Sag236 X Spy12RF) l'analisi SmaI-PFGE evidenziava nel transconiugante la scomparsa di una banda di ~200 kb, rispetto al ricevente Spy12RF, e la comparsa di un nuovo frammento di DNA di ~300 kb, che ibridava con la sonda *catQ* (Figura 19, B). Entrambi gli esperimenti confermavano il trasferimento di un elemento mobile, con dimensioni stimate in circa 110 kb.

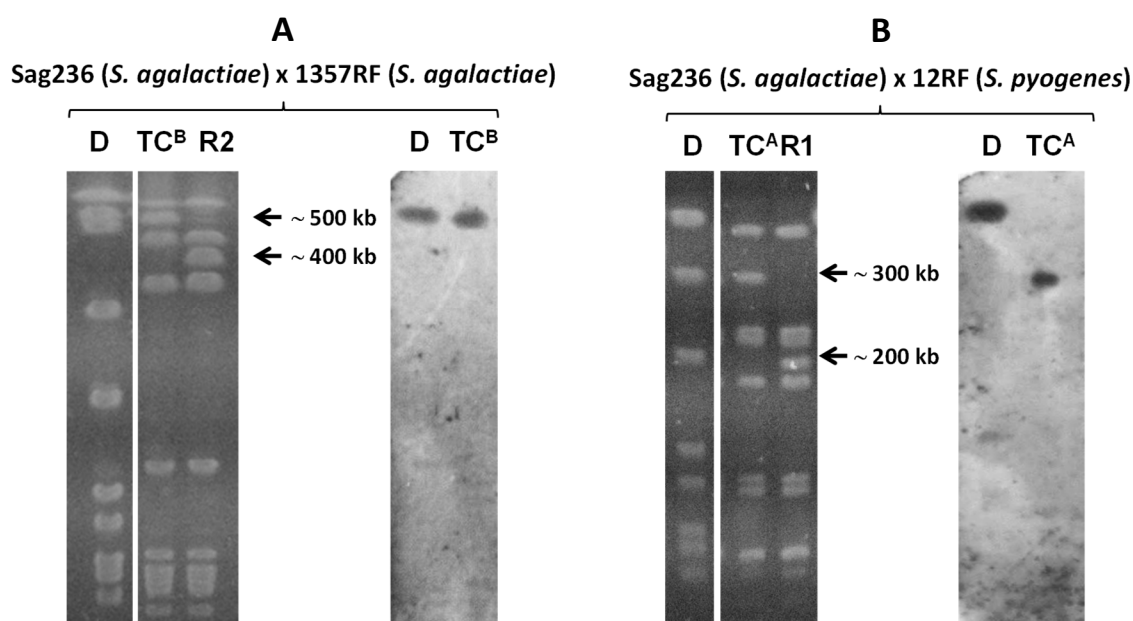


Figura 19. Analisi di SmaI-PFGE e Southern blot con la sonda *catQ* in accoppiamenti intra-specifici (A) e inter-specifici (B). D, donatore *S. agalactiae* Sag236; TC^A, transconiugante 236/12RF; R1, ricevente *S. pyogenes* 12RF; TC^B, transconiugante 236/1357RF; R2, ricevente *S. agalactiae* 1357RF.

3.2.6 Caratterizzazione del nuovo ICE mosaico

I risultati precedenti di ibridizzazione e la dimostrata associazione del modulo IQ con il gene *erm*(TR) su uno stesso elemento coniugativo, hanno spinto a studiare il nuovo elemento alla luce della recente scoperta di ICESagTR7, che veicola il gene *erm*(TR) in *S. agalactiae* (Mingoia *et al.*, 2016). ICESagTR7 ha una classica configurazione a matrioska, in cui uno o più elementi sono assemblati l'uno dentro l'altro. Prendendo questo ICE come riferimento, e con l'utilizzo di una mappatura appropriata, abbiamo indagato la sua presenza nei transconiuganti derivati da Sag236 e negli altri due isolati.

In tutti i ceppi in esame, così come in ICESagTR7, il gene *erm*(TR) era trasportato da un piccolo elemento integrativo e mobilizzabile, IMESp2907 (Giovanetti *et al.*, 2012) a sua volta inserito all'interno di un elemento più grande. Inoltre, tutti i ceppi erano positivi per due geni marcatori dell'ICE, *int* e *repA*, collocati alle due estremità dell'elemento. Utilizzando gli stessi primer specifici che avevano consentito, in studi precedenti, di mappare e sequenziare ICESpn529IQ di *S. pneumoniae* (Mingoia *et al.*, 2014) e ICESagTR7 (Mingoia *et al.*, 2016) di *S. agalactiae*, abbiamo potuto caratterizzare il nuovo elemento, che è stato denominato ICESag236.

Per ottenere maggiori informazioni alcuni amplificati sono stati parzialmente sequenziati, in particolare, quelli che mappavano le porzioni terminali dell'ICE (ampliconi a, p) e quelli per le regioni di transizione tra un elemento e l'altro di resistenza (ampliconi d, f, i, k, n). Le analisi *in silico* dei risultati evidenziavano che ICESag236 è un nuovo ICE, con una configurazione a mosaico, con una dimensione stimata di circa 110 kb. Esso sembra essere il risultato di una ricombinazione molecolare tra due ICE precedentemente descritti ed appartenenti a famiglie

diverse: ICES*Spn529IQ* di *S. pneumoniae* appartiene alla famiglia Tn5253 mentre ICES*SagTR7* di *S. agalactiae* appartiene alla famiglia ICESa2603.

Confrontando la mappa genetica dei tre elementi (Figura 20) ICES*Sag236* presenta la porzione iniziale di ICES*SagTR7*, che si estende dall'integrasi al gene codificante la relaxase, e tutta la regione terminale che contiene IMES*p2907*. Al contrario, era assente tutta la porzione contenente i geni di resistenza ai metalli pesanti (cadmio e arsenico), insieme a parte di un elemento interno caratterizzato dalla presenza di tre geni serina-ricombinasi. ICES*Spn529IQ* era inserito *in toto* nella porzione prossimale ma, rispetto al prototipo descritto in *S. pneumoniae*, presentava una delezione di circa 5 kb che comprende i moduli funzionali di integrazione/escissione (*orf1*, integrasi) e di mobilizzazione (*orf4-orf6*, geni relaxase e *mob*). L'inserzione cromosomica di ICES*Sag236* è stata confermata essere quella di tutti gli elementi che appartengono alla famiglia ICESa2603, a livello del sito di integrazione *attB* al terminale 3' del gene *rpL*, che codifica per la subunità ribosomiale L7/L12. Sebbene possono essere identificati diversi geni *rpL*, la sequenza *att* (TTATTTAAGAGTAAC) è altamente conservata negli streptococchi ed il sito è pertanto considerato un importante *hot-spot* per l'integrazione di numerosi ICE (Haenni *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016).

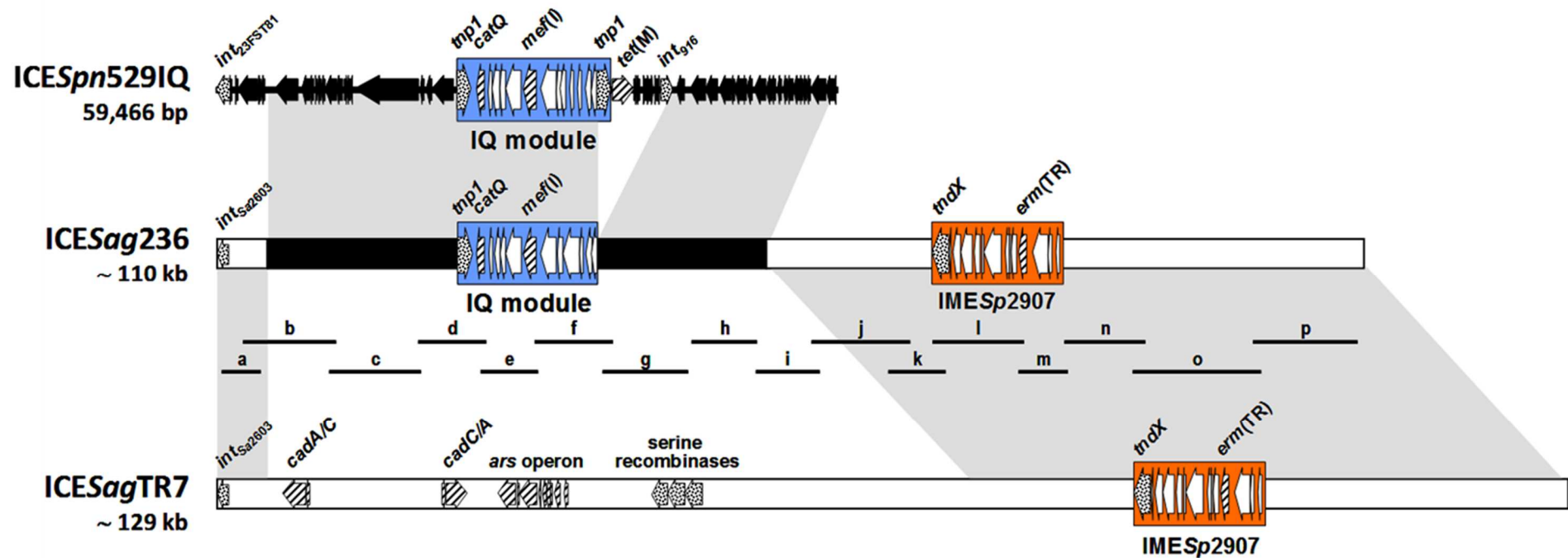


Figura 20. Rappresentazione schematica, ma in scala, di ICESag236 dal donatore di *S. agalactiae* e da alcuni transconjuganti (al centro), ottenuta dalla ricombinazione di *S. agalactiae* ICESagTR7 (in basso) e *S. pneumoniae* ICESpn529IQ (sopra). Le porzioni sequenziate sono rappresentate con le loro ORF raffigurate come frecce che puntano nella direzione della trascrizione; le porzioni parzialmente sequenziate e riconosciute dalla mappatura PCR sono rappresentate con dei rettangoli con i geni distintivi in evidenza. Le ORF di ICESpn529IQ e la parte correlata di ICESag236 sono nere, mentre i moduli IQ completamente sequenziati sono ingranditi all'interno di una casella blu. ICESagTR7 e le parti correlate di ICESag236 sono bianche, mentre l'IMESp2907, completamente sequenziata, viene mostrata ingrandita all'interno di una casella arancione. I geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti sono rappresentati a righe, mentre i geni di ricombinasi a puntini. Le aree grigie tra le ICE indicano le regioni con una stretta corrispondenza risultante dalla mappatura PCR. Le barre orizzontali sotto ICESag236 indicano gli ampliconi che hanno consentito la mappatura PCR; le lettere minuscole sopra di esse indicano le coppie di primer rilevanti (Tabella 2).

4.DISCUSSIONE

S. agalactiae, inizialmente conosciuto come agente eziologico della mastite bovina, solo negli anni '70 ha assunto un ruolo rilevante nell'ambito della patologia umana quando i casi di sepsi neonatale ad esso correlati hanno subito un notevole incremento. Ad oggi, nonostante sia un frequente colonizzatore del tratto intestinale e genito-urinario (tra il 10 e il 30% degli adulti sani sono colonizzati), è già ampiamente riconosciuto come principale responsabile delle infezioni invasive neonatali (meningiti e batteriemie) e infezioni nelle donne in gravidanza. La mortalità delle sepsi causate da *S. agalactiae* nei neonati raggiunge circa il 10% ed è particolarmente alta nei prematuri (fino al 40%); inoltre nei bambini che sopravvivono alla meningite si manifestano sequele neurologiche permanenti (Joubrel *et al.*, 2015; Skoff *et al.*, 2009; Libster *et al.*, 2012). La profilassi *intrapartum* per le donne in gravidanza colonizzate da GBS è raccomandata oramai da diversi anni, dal momento che numerosi studi clinici hanno dimostrato che la somministrazione di antibiotici in prossimità del parto riduceva drasticamente l'incidenza delle infezioni invasive ad esordio precoce nel neonato (Heelan *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni, *S. agalactiae* è stato associato a diverse infezioni invasive e non, negli adulti, specialmente in anziani e pazienti con patologie concomitanti, come diabete e malattie cardiovascolari, causando infezioni alle vie urinarie, batteriemie, endocarditi, polmoniti ed infezioni ai tessuti molli (Sendi *et al.*, 2008; Skoff *et al.*, 2009). In concomitanza all'aumentare del suo coinvolgimento in diverse patologie di rilevanza clinica e/o in soggetti

a rischio, anche le possibili opzioni terapeutiche sono iniziate a diventare un forte motivo di preoccupazione. Il farmaco di prima scelta per la profilassi ed il trattamento delle infezioni da GBS rimane la penicillina, nonostante in Asia ed in America siano stati recentemente riportati degli isolati con ridotta sensibilità (Kimura *et al.*, 2008; Longtin *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2015; Metcalf *et al.*, 2017). I macrolidi e la clindamicina sono valide alternative in caso di allergie ai β -lattamici; tuttavia, i crescenti tassi di resistenza nei confronti di questi antibiotici è stata, ripetutamente, riportata in tutto il mondo (Heelan *et al.*, 2004; Back *et al.*, 2012; De Francesco *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2018). La resistenza, inoltre, sembra essere associata alla disseminazione di alcuni cloni epidemici, ad esempio isolati che presentano il polisaccaride capsulare di tipo V e che sono prevalentemente associati con le infezioni negli adulti (Hays *et al.*, 2016). Da qui la necessità di valutare altre classi di farmaci come opzioni terapeutiche.

I fluorochinoloni rappresentano una valida alternativa per il trattamento delle infezioni da *S. agalactiae* negli adulti, in particolare la levofloxacin e la moxifloxacin, che mostrano una migliore attività nei confronti dei Gram-positivi rispetto ad altri farmaci chinolonici (Martin *et al.*, 1998; Sendi *et al.*, 2008). Tuttavia, dopo la prima segnalazione di ceppi resistenti ai fluorochinoloni, avvenuta agli inizi del 2000 in Giappone (Kawamura *et al.*, 2003), anche la resistenza a questi farmaci è andata via via emergendo in altri Paesi (Biedenbach *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2015; Hays *et al.*, 2016), con frequenze anche molto diverse, a seconda della zona geografica. Di conseguenza, è importante monitorare la comparsa di questi ceppi, studiarne le caratteristiche genetiche e controllare la loro diffusione.

Il nostro studio ha preso in considerazione ceppi GBS resistenti ai fluorochinoloni isolati nel periodo 2010-16 in diversi ospedali della regione Marche. La resistenza complessiva è stata

del 2,99%, un valore che è più del doppio di quanto riportato in precedenza in Italia (Piccinelli *et al.*, 2015). Se si considera il solo anno 2016 possiamo evidenziare un trend chiaramente in aumento, considerando il fatto che 5 degli 11 ceppi resistenti alla levofloxacina (LR) erano stati isolati nell'ultimo anno di studio. Tuttavia, la prevalenza è ancora limitata in altri Paesi europei come la Spagna (1,16%) (Miró *et al.*, 2006), la Francia (1,5%) (Hays *et al.*, 2016), il Portogallo (0,5%) (Lopes *et al.*, 2018); soprattutto se confrontata con i valori riportati in Cina (37,7%) (Wang *et al.*, 2013) ed in Giappone (18,4%) (Ueno *et al.*, 2012). Negli Stati Uniti le indagini di sorveglianza evidenziano ancora una bassa prevalenza, ma sottolineano un trend in aumento: la resistenza è infatti passata da un valore di 0,7% del 2006 (Biedenbach *et al.*, 2006) al più recente 2,3% del 2017 (Metcalf *et al.*, 2017).

La differente distribuzione geografica della resistenza ai fluorochinoloni può dipendere primariamente dalle strategie terapeutiche adottate nei diversi paesi, ma anche dal tipo di paziente e campione esaminato. Per esempio, i ceppi isolati da infezioni neonatali sono assai di rado resistenti ai fluorochinoloni (Hays *et al.*, 2016). Anche nel nostro studio, nessuno degli 11 ceppi LR aveva origine neonatale, inoltre, non sono state evidenziate differenze nei livelli di resistenza tra gli isolati clinici e quelli ottenuti dai tamponi vaginali per lo screening delle donne in gravidanza.

Il meccanismo principale di resistenza ai chinoloni è rappresentato dalla modificazione del bersaglio. Le mutazioni puntiformi, associate generalmente ad una resistenza ad alto livello, sono localizzate nella regione QRDR dei geni cromosomici *gyrA* e *parC*, che codificano per le subunità catalitiche di enzimi essenziali alla replicazione batterica, rispettivamente la DNA girasi e la topoisomerasi IV. Nell'ambito degli streptococchi, i meccanismi molecolari dell'acquisizione della resistenza sono stati indagati soprattutto in

S. pneumoniae grazie allo studio di mutanti selezionati *in vitro*. In questa specie, le mutazioni nei geni codificanti le due topoisomerasi tendono a verificarsi in modo graduale (*stepwise*), determinando un progressivo aumento del livello di resistenza ai fluorochinoloni; una prima mutazione in *parC* conferisce una resistenza di basso livello, mentre la comparsa di una seconda mutazione in *gyrA* determina un alto livello di resistenza ai fluorochinoloni (Eliopoulos *et al.*, 2004). Viceversa, questi meccanismi sono scarsamente conosciuti nella specie *S. agalactiae*.

Tutti i ceppi coinvolti nello studio mostravano un alto livello di resistenza a tutte le molecole chinoloniche considerate, ad eccezione di Sag139, che si differenziava dagli altri poiché era resistente alla norfloxacin, intermedio alla levofloxacin, e sensibile a tutte le altre molecole. Il fenotipo di Sag139 suggeriva, in analogia a quanto è dimostrato per *S. pneumoniae*, un unico bersaglio mutato. L'analisi di restrizione confermava che tutti i ceppi LR presentavano una singola mutazione nelle rispettive regioni QRDR di *parC* (Ser79) e *gyrA* (Ser81), eccetto Sag139 che presentava una sola mutazione in *parC*. Il sequenziamento ha quindi permesso di individuare la variazione aminoacidica determinata dalle mutazioni: Ser81Leu nel gene *gyrA*, codificante per la subunità A della DNA girasi e Ser79Phe nel gene *parC*, per la corrispondente subunità A della topoisomerasi IV. In generale, Ser81Leu in GyrA e Ser79Phe in ParC, sono le due sostituzioni più frequentemente riscontrate nei ceppi di *S. agalactiae*, a partire dal primo ceppo resistente ai fluorochinoloni identificato in questa specie (Kawamura *et al.*, 2003). In particolare, per quanto riguarda GyrA, sebbene in letteratura siano state descritte numerose possibili mutazioni, la sostituzione Ser81Leu è effettivamente quella più frequentemente osservata per la specie *S. agalactiae* (Biedenbach *et al.*, 2006; Wehbeh *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2015);

mentre, in altre specie, come *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, è molto più frequente la sostituzione Ser81Phe (Montanari *et al.*, 2004).

Come già evidenziato per altre specie di streptococco, anche per GBS il livello di resistenza alla levofloxacin sembra dipendere dal tipo e dalla combinazione delle mutazioni in *gyrA* e *parC* presenti in ciascun isolato (Piccinelli *et al.*, 2015).

Questo era confermato anche nel nostro studio. Il ceppo Sag139, che aveva una singola mutazione aminoacidica, Ser79Phe in ParC, mostrava una resistenza di basso livello alla levofloxacin con una MIC di 4 µg/ml; tutti gli altri ceppi che presentavano la doppia mutazione aminoacidica (Ser81Leu in GyrA e Ser79Phe in ParC) manifestavano, invece, un alto livello di resistenza ai chinoloni con valori di MIC che andavano da un minimo di 4 µg/ml per la moxifloxacin ad un massimo di 64 µg/ml per norfloxacin, ofloxacin e sparfloxacin. Da notare che i valori riportati sono considerevolmente più alti rispetto a quelli normalmente raggiunti a livello sierico durante il trattamento (3-5 µg/ml), anche se le concentrazioni tissutali possono essere più alte (Ki *et al.*, 2012).

Un secondo meccanismo coinvolto nella resistenza ai chinoloni è rappresentato dalla presenza di pompe di efflusso attivo, che di solito non conferiscono resistenza ad alto livello, ma possono facilitare la comparsa di mutazioni cromosomiche nei bersagli. È stato evidenziato che l'inattivazione di alcune pompe proteiche può determinare ipersensibilità ai chinoloni, così come una iper-espressione delle stesse - solitamente determinata da mutazioni che aumentano la trascrizione del gene strutturale della pompa - contribuendo, almeno in parte, ad una ridotta sensibilità o bassi livelli di resistenza. La resistenza ai fluorochinoloni causata da meccanismi di efflusso attivo, ampiamente descritta in *S. aureus* e *S. pneumoniae* (Baranova *et al.*, 1997; Jumbe *et al.*, 2006; Piddock *et al.*, 2006), è stata,

invece, poco studiata in altri batteri Gram-positivi. In particolare, per quanto riguarda *S. agalactiae*, in letteratura esistono pochi lavori a riguardo; ad oggi solamente un lavoro riporta un fenotipo di efflusso in ceppi che mostravano resistenza alla norfloxacin, sia mutati che non mutati in *parC*, mentre nessuna pompa di efflusso era evidenziabile nei ceppi resistenti agli altri chinoloni (Dang *et al.*, 2014).

Nei nostri ceppi è stato escluso il coinvolgimento dei sistemi di efflusso nella resistenza ai chinoloni poiché i livelli di MIC rimanevano invariati in presenza dello specifico inibitore reserpina, sia in quei ceppi che presentavano entrambe le mutazioni, sia nell'isolato Sag139 che presentava la sola mutazione in *parC*.

Per poter stabilire la presenza di eventuali relazioni clonali tra gli 11 ceppi GBS-LR esaminati nel nostro studio, essi sono stati tipizzati mediante PFGE e MLST ed in seguito a determinazione del tipo capsulare e delle proteine di virulenza (Alp family).

Il polisaccaride capsulare (CPS) è uno dei più importanti fattori coinvolti nella virulenza dei ceppi di *S. agalactiae*. Studi epidemiologici hanno dimostrato la predominanza di particolari sierotipi nelle infezioni neonatali invasive rispetto ai tipi coinvolti nelle infezioni degli adulti: il CPS di tipo III solitamente è predominante nelle infezioni neonatali (Lamagni *et al.*, 2013; Murayama *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2018), mentre i sierotipi Ib e V sono maggiormente responsabili delle infezioni invasive adulte (Tazi *et al.*, 2011; Morozumi *et al.*, 2016; Skoff *et al.*, 2009).

Nel nostro studio, prevalgono il CPS di tipo Ib e V, seguiti dal sierotipo III e VI. Anche in Giappone (Murayama *et al.*, 2009) e più recentemente in Taiwan (Lin *et al.*, 2014) e in Francia (Hayes *et al.*, 2016) è stata riportata la prevalenza del polisaccaride capsulare di tipo Ib e V in ceppi di *S. agalactiae* resistenti ai fluorochinoloni, mentre in Cina prevale il

tipo III (Wang *et al.*, 2013). Inoltre, il polisaccaride capsulare di tipo V è quello associato, con più frequenza, alla resistenza a diversi antibiotici non β -lattamici, in particolare ai macrolidi (Hayes *et al.*, 2016). Questa distribuzione era presente anche nei nostri isolati LR, dove la maggior parte dei ceppi resistenti ai macrolidi avevano una capsula di tipo V, mentre tutti i ceppi sensibili agli antibiotici non chinolonici mostravano il tipo Ib.

La distribuzione dei sierotipi capsulari può essere molto variabile, in base alla regione geografica e all'origine etnica; inoltre, la virulenza di isolati clinici con composizione capsulare simile può variare ampiamente, suggerendo che altri fattori di virulenza batterica, oltre alla capsula, sono coinvolti nella patogenesi di *S. agalactiae* (Spelleberg, 2000). Particolare interesse è rivolto alle proteine di superficie della cosiddetta famiglia *alpha-like protein* (Alp). I diversi alleli *alp* (*alphaC*, *rib*, *alp2*, *alp3*, *alp4*, *epsilon*), codificanti le corrispondenti varianti antigeniche, sono solitamente associati con specifici tipi capsulari: tali associazioni peculiari consentono di tipizzare i ceppi ed in qualche caso di tracciare la circolazione di cloni epidemici. Diversi studi sui ceppi virulenti, appartenenti al CC17 e responsabili di infezioni invasive, riportano l'associazione con la sola variante Rib, considerata un importante fattore di virulenza coinvolto nell'elusione della protezione immunitaria (Almeida *et al.*, 2017).

Il nostro studio ha evidenziato che la maggior parte dei ceppi presentava le associazioni *alphaC*-Ib (4 ceppi) e *epsilon*-V (4 ceppi); due GBS evidenziavano l'associazione *rib*-III; un solo isolato aveva *rib*-VI. Non sempre tali associazioni sono investigate e riportate in letteratura, tuttavia la medesima associazione della proteina AlphaC con la capsula di tipo Ib era prevalente anche nel precedente lavoro italiano (Piccinelli *et al.*, 2015).

Un potente strumento per le indagini epidemiologiche è la caratterizzazione dei ceppi mediante la *Multilocus Sequence Typing* (MLST), procedura *nucleotide sequence based* che consente di confrontare i polimorfismi genetici di ceppi isolati in differenti aree geografiche in maniera non ambigua.

ST1, ST17, ST19 e ST23 sono i principali ceppi di *S. agalactiae* che causano infezioni nell'uomo e sono anche i più diffusi in Italia (Gherardi *et al.*, 2007). Il clone ST17, in particolare, comprende i ceppi ipervirulenti di *S. agalactiae* ed è il principale ST coinvolto nelle meningiti neonatali (Almeida *et al.*, 2017). Questi ceppi possiedono un fattore di virulenza, l'adesina HvgA, che aumenta la loro capacità di invadere il sistema nervoso centrale dei neonati; viceversa, dato che l'incidenza delle meningiti causate da GBS negli adulti è molto inferiore, gli ST17 sono rari in questa categoria di soggetti (Tazi *et al.*, 2010), mentre sono più frequenti le infezioni sostenute da ST19, spesso resistenti o multiresistenti, e da pochi altri STs.

Il nostro studio conferma in parte i dati di letteratura, infatti nell'ambito degli 11 ceppi LR la maggioranza apparteneva al ST19 e al ST10, mentre ST17 e ST1 erano entrambi rappresentati da un unico isolato. Il fatto che nessuno degli isolati era di origine neonatale potrebbe spiegare la bassa presenza di ST17 nella nostra collezione di ceppi LR. Inoltre, tutti i ceppi ST19 erano multiresistenti, facendoci supporre che il *sequence type* 19 fosse il principale responsabile della diffusione delle antibiotico-resistenze.

In letteratura non è chiaro se lo sviluppo della resistenza ai fluorochinoloni in *S. agalactiae* sia dovuto alla diffusione di alcuni ceppi clonali (Pan *et al.*, 1996; Murayama *et al.*, 2009) oppure si verifichi in modo indipendente in isolati filogeneticamente non correlati (Wu *et al.*, 2008).

Nel nostro studio solamente quattro degli 11 ceppi GBS-LR appartenevano chiaramente ad un singolo clone condividendo: sierotipo capsulare Ib, proteina di virulenza Alpha C, identico profilo di PFGE e stesso sequence type, ST10. E' curioso notare che il clone era costituito da ceppi esclusivamente resistenti ai fluorochinoloni e sensibili a tutti gli altri antibiotici, compresa la tetraciclina, soprattutto considerando che nella nostra collezione di laboratorio, così come in numerosi lavori in tutto il mondo la resistenza alla tetraciclina, mediata dal gene *tet(M)*, è vicina o supera il 90% (Mingoia *et al.*, 2013; Da Cunha *et al.*, 2014). Le analisi di tipizzazione dimostravano la presenza di un secondo *cluster* comprendente 4 ceppi geneticamente correlati che condividevano capsula di tipo V, proteina di virulenza Epsilon e ST19, ma presentavano profili di PFGE non identici. I nostri risultati si discostano in parte da quelli ottenuti da Piccinelli *et al.*, i quali affermano che nel 2015 in Italia la resistenza ai fluorochinoloni sembrava essere associata alla comparsa di un clone ST19 (CC19)/sierotipo Ib/epsilon (Piccinelli *et al.*, 2015), mentre rispecchiano quelli riportati in un recente lavoro effettuato in Francia, in cui la resistenza ai chinoloni sembrava essere associata alla diffusione di un clone ST19/CPS V (Hayes *et al.*, 2016). In altri paesi, invece, specialmente in Asia, la resistenza ai flurochinoloni risulta essere associata agli isolati appartenenti ai complessi clonali CC10 e CC19 (Wang *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Morozumi *et al.*, 2016). Per quanto riguarda l'unico isolato ST1 del nostro studio, esso presentava la capsula di tipo VI, una variante isolata molto raramente in Europa e caratteristicamente diffusa in Asia. L'insolita associazione tra il CC1 e la capsula di tipo VI, identificata sia in ceppi invasivi che colonizzanti, è stata riportata di recente in Taiwan (Lin *et al.*, 2016).

La differente distribuzione tra le aree geografiche di ceppi di *S. agalactiae* con diversi tipi capsulari, ST e mutazioni a livello della regione QRDR suggerisce che la resistenza ai

chinoloni avviene attraverso l'acquisizione di mutazioni indipendenti (Piccinelli *et al.*, 2015). Tuttavia, in base alle conoscenze attuali, non si può escludere la selezione e la successiva diffusione di ceppi dovuta ad un uso intensivo di fluorochinoloni, così come l'uso massiccio della tetraciclina, negli anni '70, ha specificatamente selezionato cloni di *S. agalactiae* adattati all'uomo (Sorensen *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda la resistenza al cloramfenicolo, i pochi lavori che riportano ceppi di *S. agalactiae* resistenti forniscono un quadro molto variegato. Un'indagine di sorveglianza effettuata negli Stati Uniti attesta la percentuale di resistenza allo 0.1% (Metcalf *et al.*, 2017); in Brasile, la percentuale di resistenza è risultata molto più consistente, intorno al 5%, ed è caratteristicamente associata alla resistenza alla levofloxacina (Botelho *et al.*, 2018).

Considerando la bassa prevalenza della resistenza al cloramfenicolo in *S. agalactiae*, riportata in alcuni studi precedenti (Biedenbach *et al.*, 2003; Figueira-Coelho *et al.*, 2004; Biedenbach *et al.*, 2006; Shabayek *et al.*, 2014), è stato sorprendente notare che quattro degli undici isolati LR erano resistenti anche al cloramfenicolo.

Le indagini molecolari evidenziavano che in Sag690 la resistenza al cloramfenicolo era mediata dal gene *cat_{pC194}*, mentre negli altri tre ceppi dal gene *catQ*.

Il determinante di resistenza *cat_{pC194}* era stato inizialmente identificato e sequenziato nel plasmide pC194 di *Staphylococcus aureus* (Horinouchi *et al.*, 1982); successivamente, lo stesso plasmide pC194 era stato identificato in *S. pneumoniae* in forma linearizzata, integrato a livello cromosomico all'interno del trasposone coniugativo Tn5253 (Ayoubi *et al.*, 1991). Nella specie *S. agalactiae*, il gene *cat_{pC194}* sembra essere molto raro, difatti, le analisi *in silico* dimostrano la presenza di questo gene solamente in uno degli oltre 1000

genomi sequenziati. Anche se la caratterizzazione dell'elemento genetico è ancora da completare, i primi accertamenti evidenziano che è presente una singola copia del gene *cat*_{pC194} ed è assente il tradizionale plasmide di stafilococco; pC194 non è stato dimostrato neanche in una forma linearizzata ed integrata come in Tn5253 di *S. pneumoniae*. Analisi di PCR mapping hanno infine evidenziato che *cat*_{pC194} è associato con il gene *erm*(B), che nel ceppo Sag690 conferisce la resistenza cMLS.

Per quanto riguarda invece, il determinante genetico *catQ*, esso è stato originariamente descritto in *C. perfringens* (Rood *et al.*, 1989) e successivamente in diverse specie di streptococchi viridanti (VGS) (Brenciani *et al.*, 2014; Chaffanel *et al.*, 2015), ma non era ancora mai stato descritto in *S. agalactiae*. Di conseguenza, la dimostrazione di *catQ* in tre isolati di *S. agalactiae* non duplicati, ottenuti da materiali clinici diversi e provenienti da ospedali diversi, tenendo conto della bassa prevalenza (Biedenbach *et al.*, 2003) e le scarse conoscenze riguardo gli elementi genetici coinvolti, ci ha spinto ad approfondire l'argomento.

Tutti e tre i ceppi *catQ*-positivi presentavano un fenotipo multiresistente, infatti oltre alla già descritta resistenza ai fluorochinoloni ed al cloramfenicolo, erano resistenti alla tetraciclina, per la presenza del gene *tet*(M) e mostravano un fenotipo di resistenza inducibile (iMLS) agli antibiotici MLS_B, mediato dal gene *erm*(TR). L'espressione di *erm*(TR) mascherava fenotipicamente la presenza del gene *mef*(I), che caratteristicamente è associato con *catQ* (Mingoia *et al.*, 2015), la cui presenza è stata dimostrata mediante analisi molecolari. Tutti e tre i ceppi erano positivi per *mef*(I) la cui sequenza dimostrava il 99% di identità con il gene originariamente descritto e sequenziato in *S. pneumoniae* (Mingoia *et al.*, 2007).

Il segmento genetico (~5.8 kb) che si estende dal gene *catQ* al gene *mef* [prevalentemente *mef(I)* ma anche *mef(E)* in alcuni VGS] è estremamente conservato in tutti gli streptococchi in cui è stato evidenziato e caratterizzato (Mingoia *et al.*, 2007; Del Grosso *et al.*, 2011; Brenciani *et al.*, 2014; Chaffanel *et al.*, 2015) ed è stato denominato modulo IQ (Mingoia *et al.*, 2015).

Pertanto, una volta dimostrata la presenza di un modulo IQ-like anche nei nostri ceppi, esso è stato caratterizzato mediante *PCR mapping* e sequenziamento, usando come riferimento il prototipo del modulo IQ di *S. pneumoniae* 529 (Mingoia *et al.*, 2007). Il modulo IQ-like di *S. agalactiae* (DNA identity, 99%) differisce dall'elemento originale unicamente per l'assenza del gene *tnp1* codificante una trasposasi, a monte di *mef(I)*.

Negli esperimenti di coniugazione il modulo IQ-like era costantemente trasferito insieme con il gene *erm*(TR), sia in incroci intraspecifici che interspecifici. Tutti i transconiuganti esaminati presentavano un'insolita e, ancora mai descritta, associazione tra i tre geni di resistenza *mef(I)*, *catQ* ed *erm*(TR) associati all'interno di un elemento integrativo e coniugativo (ICE) di circa 110 kb che è stato denominato ICESag236. L'elemento ha una configurazione che abbiamo definito a mosaico essendo derivato dalla ricombinazione di due ICE appartenenti a famiglie diverse: l'ICESpn529IQ di *S. pneumoniae* che appartiene alla famiglia Tn5253 (Mingoia *et al.*, 2014) e l'ICESagTR7 di *S. agalactiae* appartenente alla famiglia ICESa2603 (Mingoia *et al.*, 2016).

La diversità del *flexible gene pool* di *S. agalactiae* è ampiamente documentata, fin dai primi studi di analisi comparativa genomica (Tettelin *et al.*, 2005). Il cromosoma ha un'organizzazione composita, con uno scheletro (*core genome*) stabile e numerose regioni variabili per genoma, costituite in prevalenza da ICE (Brochet *et al.*, 2008). Data la loro

caratteristica struttura modulare, gli ICE possono evolvere in forme sempre più complesse, in seguito ad eventi di ricombinazione genica che si verificano sia a livello dei moduli funzionali di integrazione/escissione e/o coniugazione, sia per acquisizione di singoli geni o di altri elementi genetici.

La natura composta di ICESag236 conferma la grande flessibilità genomica di *S. agalactiae* ed il ruolo importante svolto da elementi mobili come gli ICE nella diffusione dell'antibiotico-resistenza. La particolare configurazione di ICESag236 suggerisce che esso sia stato originato da eventi di ricombinazione a livello dei moduli funzionali di mobilizzazione dei rispettivi ICESpn529 e ICESagTR7.

Considerato il limitato utilizzo del cloramfenicolo nel trattamento delle infezioni di *S. agalactiae* nell'uomo, sembra poco probabile che l'emergenza e la diffusione della resistenza ad esso sia dovuta alla pressione selettiva esercitata dall'impiego dell'antibiotico. Tuttavia, i determinanti di resistenza più comuni, i geni *cat*, sono molto diffusi nell'ambiente e sono trasmissibili nell'ambito di diverse specie batteriche mediante una varietà di elementi genetici mobili. La resistenza potrebbe quindi originarsi primariamente in specie batteriche ambientali in seguito ad una co-selezione da parte di altri farmaci come è stato dimostrato per il gene *cfr* (Schwarz *et al.*, 2016) che conferisce resistenza a fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A (fenotipo PhLOPS_A). In *S. agalactiae* in particolare, è già stato riportato un fenomeno di selezione, relativo alla resistenza alla tetraciclina, definito a "collo di bottiglia" per cui solo alcuni cloni di origine animale, nei quali la resistenza a questo antibiotico era già fissata, hanno evoluto un adattamento all'essere umano (Da Cunha *et al.*, 2014). E' possibile che, una volta avvenuta l'inserzione stabile nel genoma di GBS di elementi genetici mobili e

largamente diffusi in cocchi Gram-positivi, come Tn916 e Tn5801, essi siano mantenuti con un costo limitato di *fitness* favorendo, di fatto, la diffusione della resistenza.

I risultati ottenuti in questo studio mettono in evidenza entrambe le possibilità di disseminazione delle antibiotico-resistenze. La resistenza ai fluorochinoloni sembra per lo più associata con la dispersione di specifici cloni (in particolare CC10 e CC19), mentre la resistenza al cloramfenicolo potrebbe dipendere dal trasferimento orizzontale degli ICE.

Sebbene la caratterizzazione molecolare dei ceppi LR ha riguardato i ceppi isolati nel periodo 2010-2016, la sorveglianza è proseguita per tutto il 2017 e per la prima metà del 2018. Nel 2017 sono stati raccolti 137 isolati e abbiamo identificato un totale di 6 isolati LR (4,4%); nei primi 6 mesi del 2018 la resistenza è salita al 6,6% (5/76 isolati). Poiché i chinoloni non sono utilizzati nel trattamento delle infezioni nelle donne in gravidanza e nei bambini, i ceppi di *S. agalactiae*, soprattutto quelli per gli studi di colonizzazione prenatale, non vengono solitamente testati per i chinoloni nel normale *workflow* di laboratorio. Sarebbe invece di grande utilità incrementare la sorveglianza, estendendo i test di sensibilità ai fluorochinoloni a tutti gli isolati clinici di *S. agalactiae*.

5. Bibliografia

Almeida A, Rosinski-Chupin I, Plainvert C, Douarre PE, Borrego MJ, Poyart C, *et al.* 2017. Parallel Evolution of Group B *Streptococcus* Hypervirulent Clonal Complex 17 Unveils New Pathoadaptive Mutations. *mSystems*. 2(5).

Ayoubi P, Kilic AO, Vijayakumar MN. 1991. Tn5253, the pneumococcal Ω (*cat tet*) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *J Bacteriol*. 173:1617–1622.

Back EE, O'Grady EJ, Back JD. 2012. High Rates of Perinatal Group B *Streptococcus* Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(2):739–742.

Baldassari L. 2007. Infezioni da streptococco di gruppo B. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 07/28).

Bannam TL and Rood JI. 1991. Relationship between the *Clostridium perfringens catQ* gene product and chloramphenicol acetyltransferases from other bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 35:471–476.

Baranova NN and Neyfakh AA. 1997. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41(6):1396–1398.

Barros RR, Kegele FC, Paula GR, Brito MA, Duarte RS. 2012. Molecular Characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 16:476-8.

Bellais S, Six A, Fouet A, Longo M, Dmytruk N, Glaser P, *et al.* 2012. Capsular switching in group B *Streptococcus* CC17 hypervirulent clone: a future challenge for polysaccharide vaccine development. *J Infect Dis*. 206: 1745-1752.

Biedenbach DJ, Stephen JM, Jones RN. 2003. Antimicrobial susceptibility profile among beta-hemolytic *Streptococcus* spp. collected in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program—North America, 2001. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 46: 291–4.

Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. 2006. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 55(2): 119–27.

Bjorkeng, EK, Hjerde E, Pedersen T, Sundsfjord A, Hegstad K. 2013. ICESluvan, a 94-kilobase mosaic integrative conjugative element conferring interspecies transfer of VanB-type glycopeptide resistance, a novel bacitracin resistance locus, and a toxin-antitoxin stabilization system. *J Bacteriol*. 195: 5381–5390.

Botelho ACN, Oliveira JG, Damasco AP, Santos KTB, Ferreira AFM, Rocha GT, *et al*. 2018. *Streptococcus agalactiae* carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLoS One*. 13(5): e0196925.

Brenciani A, Morroni G, Pollini S, Tiberi E, Mingoia M, Varaldo PE, *et al*. 2016. Characterization of novel conjugative multiresistance plasmids carrying *cfr* from linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from Italy. *J Antimicrob Chemother*. 71: 307–313.

Brenciani A, Tiberi E, Tili E, Mingoia M, Palmieri C, Varaldo PE, *et al*. 2014. Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group streptococci. *J Antimicrob Chemother*. 69: 1197–204.

Brochet M, Couvé E, Glaser P, Guédon G, Payot S. 2008. Integrative Conjugative Elements and Related Elements Are Major Contributors to the Genome Diversity of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol*. 190: 6913–6917.

Burrus V and Waldor MK. 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol*. 155:376–86.

Camilli R, Del Grosso M, Iannelli F, Pantosti A. 2008. New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(2):619–25.

- Chaffanel F, Charron-Bourgoin F, Libante V, Leblond-Bourget N, Payot S. 2015. Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol*. 81: 4155–63.
- Chen C, Tang JQ, Dong W, Wang CJ, Feng YJ, Wang J, *et al*. 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 chinese isolates. *PLoS ONE*. 2: e315.
- Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, *et al*. 2005. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun*. 73: 3096-3103.
- Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wang Y, Wessels MR. 2001. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J Biol Chem*. 276: 139-146.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, *et al*. 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*. 22: 867–879.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. Wayne, PA: CLSI.
- Cochetti I, Vecchi M, Mingoia M, Tili E, Catania MR, Manzin A, *et al*. 2005. Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 4999–5006.
- Compain F, Hays C, Touak G, Dmytruk N, Trieu-Cuot P, Joubrel C, *et al*. 2014. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates harboring small *erm*(T)-carrying plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(11):6928-30.
- Creti R, Fabretti F, Orefici G, von Hunolstein C. 2004. Multiplex PCR Assay for Direct Identification of Group B Streptococcal Alpha-Protein-Like Protein Genes. *J Clin Microbiol*. 42(3): 1326–1329.
- Da Cunha V, Davies MR, Douarre PE, Rosinski-Chupin I, Margarit I, Spinali S, *et al*. 2014. *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat Commun*. 5:4544.
- Dang TN, Srinivasan U, Britt Z, Marrs CF, Zhang L, Ki M, *et al*. 2014. Efflux-mediated resistance identified among norfloxacin resistant clinical strains of group B *Streptococcus* from South Korea. *Epidemiol Health*. 36: e2014022.

- Davies MR, Shera J, Van Domselaar GH, Sriprakash KS, McMillan DJ. 2009. A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic Streptococci. *J Bacteriol.* 191:2257–2265.
- De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. 2012. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 31:1741–1747.
- Del Grosso M, Camilli R, Barbabella G, Blackman Northwood J, Farrel DJ, Pantosti A. 2011. Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3226-30.
- Delorme C, Bartholini C, Luraschi M, Pons N, Loux V, Almeida M, *et al.* 2011. Complete genome sequence of the pigmented *Streptococcus thermophilus* strain JIM8232. *J Bacteriol.* 193: 5581–5582.
- Doherty N, Trzcinski K, Pickerill P, Zawadzki P, Dowson CG. 2000. Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumonia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(11):2979-84.
- Doran KS and Nizet V. 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol.* 54: 23-31.
- Doran KS, Chang JC, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V. 2002. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis.* 185: 196-203.
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, *et al.* 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 379: 547-556.
- Ehrlich JQ, Bartz QR, Smith RM, Joslyn, Burkholder PR. 1947. Chloromycetin a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science.* 106, 417.
- Eliopoulos GM. 2004. Quinolone resistance mechanisms in pneumococci. *Clin Infect Dis.* 38(4): 350–356.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.

Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. 2004. *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide resistant isolates. *Microb Drug Resist.* 10:31–36.

Gherardi G, Imperi M, Baldassarri L, Pataracchia M, Alfarone G, Recchia S, *et al.* 2007. Molecular Epidemiology and Distribution of Serotypes, Surface Protein, and Antibiotic Resistance among Group B Streptococci in Italy. *Journal of Clinical Microbiology.* Sept. Vol. 45. N° 9. p. 2909-2916.

Giovanetti E, Brenciani A, Tiberi E, Bacciaglia A, Varaldo PE. 2012. ICESp2905, the *erm*(TR)-*tet*(O) element of *Streptococcus pyogenes*, is formed by two independent integrative and conjugative elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 591–4.

Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.* 7(8): e1002222.

Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec JY Payot S. 2010. Diversity and Mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol.* 76: 7957–7965.

Hays C, Louis M, Plainvert C, Dmytruk N, Touak G, Trieu-Cuot P. 2016. Changing epidemiology of group B *Streptococcus* susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 60: 7424–7430.

Heelan JS, Hasenbein ME, McAdam AJ. 2004. Resistance of group B *streptococcus* to selected antibiotics, including erythromycin and clindamycin. *J Clin Microbiol.* 42:1263–1264.

Holden MTG, Hauser H, Sanders M, Thi HN, Cherevach I, Cronin A, *et al.* 2009. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS ONE.* 4: e6072.

Hooper DC. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis.* 2: 530–538.

Hooper DC and Jacoby GA. 2016. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6: a025320.

Horinouchi S and Weisblum B. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J Bacteriol.* 150:815–825.

Huang J, Liang Y, Guo D, Shang K, Ge L, Kashif J, *et al.* 2016. Comparative genomic analysis of the ICESa2603 family ICEs and spread of *erm*(B)- and *tet*(O)-carrying transferable 89K-subtype ICEs in swine and bovine isolates in China. *Front Microbiol.* 7: 55.

Huang J, Ma J, Shang K, Hu X, Liang Y, Li D, *et al.* 2016. Evolution and Diversity of the Antimicrobial Resistance Associated Mobilome in *Streptococcus suis*: A Probable Mobile Genetic Elements Reservoir for Other Streptococci. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:118.

Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G, Baldassarri L, Orefici G, Creti R. 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods.* 80(2):212-4.

Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan M, Kunst F, *et al.* 2003. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol.* 41:2530–2536.

Joubrel C, Tazi A, Six A, Dmytruk N, Touak G, Bidet P, *et al.* 2015. Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007-2012. *Clin Microbiol Infect.* 21:910–916.

Jumbe NL, Louie A, Miller MH, Liu W, Deziel MR, Tam VH, *et al.* 2006. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):310–317.

Kataja J, Seppala H, Skurnik M, Sarkkinen H, Huovinen P. 1998. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1493-4.

Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, *et al.* 2003. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3605–3609.

Ki M, Srinivasan U, Oh KY, Kim MY, Shin J-H, Hong HL, *et al.* 2012. Emerging fluoroquinolone resistance in *Streptococcus agalactiae* in South Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:3199–3205.

Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, *et al.* 2008. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2890–2897.

Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, *et al.* 2013. High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B *Streptococcus*. *J Antimicrob Chemother.* 68(7):1533-6.

Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC. 2000. Mosaicism in the alfa-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:9630-5.

Lamagni TL, Keshishian C, Efstratiou A, Guy R, Henderson KL, Broughton K, *et al.* 2013. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin Infect Dis*. 57:682–688.

Lang S and Palmer M. 2003. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem*. 278: 38167-38173.

Lartigue MF, Poulard AF, Al Safadi R, Pailhories H, Domelier-Valentin AS, van der Mee-Marquet N, *et al.* 2011. Variability of *neuD* transcription levels and capsular sialic acid expression among serotype III group B *Streptococcus* strains. *Microbiology*. 157: 3282-3291.

Law MR, Palomaki G, Alfirovic Z, Gilbert R, Heath P, McCartney C, *et al.* 2005. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J Med Screen*. 12:60-8.

Libster R, Edwards KM, Levent F, Edwards MS, Rench MA, Castagnini LA, *et al.* 2012. Long-term Outcomes of Group B Streptococcal Meningitis. *Pediatrics*. VOLUME 130/ISSUE 1.

Lin HC, Chen CJ, Chiang KH, Yen TY, Ho CM, Hwang KP, *et al.* 2014. Clonal dissemination of invasive and colonizing clonal complex 1 of serotype VI group B *Streptococcus* in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. xx:1–8.

Lin IH, Liu TT, Teng YT, Wu HL, Liu YM, Wu KM, *et al.* 2011. Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS ONE*. 6: e20519.

Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 18: 102-127.

Liu GY, Nizet V. 2004. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 9: 1794-1802.

Liu J, Xu R, Zhong H, Zhong Y, Xie Y, Li L, *et al.* 2018. Prevalence of GBS serotype III and identification of a ST 17-like genotype from neonates with invasive diseases in Guangzhou, China. *Microb Pathog*. 120:213-218.

- Longtin J, Vermeiren C, Shahinas D, Tamber GS, McGeer A, Low DE, *et al.* 2011. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:2983–2985.
- Lopes E, Fernandes T, Machado MP, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M, *et al.* 2018. Increasing macrolide resistance among *Streptococcus agalactiae* causing invasive disease in non-pregnant adults was driven by a single capsular-transformed lineage, Portugal, 2009 to 2015. *Euro Surveill.* 23(21).
- Martin SJ, Meyer JM, Chuck SK, Jung R, Messick CR, Pendland SL. 1998. Levofloxacin and sparfloxacin: new quinolone antibiotics. *Ann Pharmacother.* 32:320–336.
- McCoy LS, Xie Y, Tor Y. 2011. Antibiotics that target protein synthesis. *WIREs RNA.* 2:209–232.
- Metcalfe BJ, Chochua S, Gertz RE, Hawkins PA, Ricaldi J, Li Z, *et al.* 2017. Short-read whole genome sequencing for determination of antimicrobial resistance mechanisms and capsular serotypes of current invasive *Streptococcus agalactiae* recovered in the USA. *Clin Microbiol Infect.* 23(8): 574.e7-574.e14.
- Mingoia M, Morici E, Brenciani A, Giovanetti E, Varaldo PE. 2015. Genetic basis of the association of resistance genes *mef(I)* (macrolides) and *catQ* (chloramphenicol) in streptococci. *Front Microbiol.* 5: 747.
- Mingoia M, Morici E, Marini E, Brenciani A, Giovanetti E, Varaldo PE. 2016. Macrolide resistance gene *erm(TR)* and *erm(TR)*-carrying genetic elements in *Streptococcus agalactiae*: characterization of ICESagTR7, a new composite element containing IMESp2907. *J Antimicrob Chemother.* 71: 593-600.
- Mingoia M, Morici E, Morroni G, Giovanetti E, Del Grosso M, Pantosti A, *et al.* 2014. Tn5253 family integrative and conjugative elements carrying *mef(I)* and *catQ* determinants in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58: 5886-93.
- Mingoia M, Morici E, Tili E, Giovanetti E, Montanari MP, Varaldo PE. 2013. Characterization of Tn5801.Sag, a variant of *Staphylococcus aureus* Tn916 family transposon Tn5801 that is widespread in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(9):4570-4.
- Mingoia M, Tili E, Manso E, Varaldo PE, Montanari MP. 2011. Heterogeneity of Tn5253-like composite elements in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 1453-9.

- Mingoia M, Vecchi M, Cochetti I, Tili E, Vitali LA, Manzin A, *et al.* 2007. Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mef(I)* and the chloramphenicol resistance gene *catQ*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3983–3987.
- Miró E, Rebollo M, Rivera A, Alvares MT, Navarro F, Mirelis B, *et al.* 2006. *Streptococcus agalactiae* highly resistant to fluoroquinolones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24:562–563.
- Mitchell TJ. 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nat Rev Micro.* 1: 219-230.
- MMWR, 2010. Prevention of Perinatal Group B *Streptococcus* Disease. 59:1-36.
- Montanari MP, Ferrante L, Tili E, Cochetti I, Rossi V, Varaldo PE. 2005. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of ulifloxacin, the active metabolite of prulifloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 17(2):138-42.
- Montanari MP, Tili E, Cochetti I, Mingoia M, Manzin A, Varaldo PE. 2004. Molecular characterization of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolone emerging in Italy. *Microb Drug Resist.* 10(3): 209-17.
- Morici E, Simoni S, Brenciani A, Giovanetti E, Varaldo PE, Mingoia M. 2017. A new mosaic integrative and conjugative element from *Streptococcus agalactiae* carrying resistance genes for chloramphenicol (*catQ*) and macrolides [*mef(I)* and *erm(TR)*]. *J Antimicrob Chemoter.* 72(1):64-67.
- Morozumi M, Wajima T, Takata M, Iwata S, Ubukata K. 2016. Molecular characteristics of group B streptococci isolated from adults with invasive infections in Japan. *J Clin Microbiol.* 54:2695–2700.
- Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, *et al.* 2009. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2650–2653.
- Murray IA and Shaw WV. 1997. O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1–6.
- Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, *et al.* 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun.* 65: 5074-5081.
- Olsvik B, Olsen I, Tenover FC. 1995. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 10: 87-92.

- Palmieri C, Magi G, Creti R, Baldassarri L, Imperi M, Gherardi G, *et al.* 2012. Interspecies mobilization of an *ermT*-carrying plasmid of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* by a coresident ICE of the ICESa2603 family. *J Antimicrob Chemother.* 68(1):23-6.
- Palmieri C, Magi G, Mingoia M, Bagnarelli P, Ripa S, Varaldo PE, *et al.* 2012. Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 4697-702.
- Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:2321–2326.
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, *et al.* 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *Jama.* 299: 2056-2065.
- Piccinelli G, Gargiulo F, Corbellini S, Ravizzola G, Bonfanti C, Caruso A, *et al.* 2015. Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:2466–2469.
- Piddock LJ. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 19(2):382–402.
- Ramaswamy SV, Ferreri P, Flores AE, Paoletti LC. 2006. Molecular characterization of non typeable group B streptococcus. *J Clin Microbiol.* 44: 2398-2403.
- Ring A, Braun JS, Nizet V, Stremmel W, Shenep JL. 2000. Group B streptococcal beta-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J Infect Dis.* 182: 150-157.
- Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, Giovanetti E, Montanari MP, Prenna M, *et al.* 2001. Smal macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist.* 7(1):65-71.
- Roberts AP and Mullany P. 2009. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* 17: 251–258.
- Roberts AP and Mullany P. 2011. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 35: 856–871.
- Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2823-2830.

- Rood JI, Jefferson S, Bannam TL, Wilkie JM, Mullany P, Wren BW. 1989. Hybridization analysis of three chloramphenicol resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 33: 1569–74.
- Rubens CE, Heggen LM, Haft RF, Wessels MR. 1993. Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol Microbiol*. 8: 843-855.
- Ryu H, Park Y-J, Kim Y, Chang J, Yu JK. 2014. Dominance of clonal complex 10 among the levofloxacin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolated from bacteremic patients in a Korean hospital. *J Infect Chemother*. 20:509–511.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*. 28: 519–542.
- Schwarz S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Brenner Michael G, Feßler AT, *et al*. 2016. Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(11).
- Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, *et al*. 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet*. 38: 779-86.
- Seki T, Kimura K, Reid ME, Miyazaki A, Banno H, Jin W, *et al*. 2015. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *J Antimicrob Chemother*. 70:2725–2728.
- Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A. 2008. Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection*. 36:100–111.
- Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:257-262.
- Shabayek S and Abdalla S. 2014. Macrolide- and tetracycline-resistance determinants of colonizing group B *Streptococcus* in women in Egypt. *J Med Microbiol*. 63:1324–1327.
- Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Gershman K, *et al*. 2009. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007. *Clin Infect Dis*. 49:85–92.
- Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. 2007. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J Clin Microbiol*. 45: 2929-36.

Sorensen UBS, Poulsen K, Ghezzi C, Margarit I, Kilian M. 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *MBio*. 1: e00178-10.

Spelleberg B. 2000. Pathogenesis of neonatal *S. agalactiae* infections. *Microbes Infect*. 2:1733–1742.

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 40: 2562-6.

Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:1817-1824.

Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, et al. 1997. *mefE* is necessary for erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 2251–2255.

Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. 2010. The surface protein HvgA mediates group B *streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med*. 207:2313–2322.

Tazi A, Morand PC, Réglier-Poupet H, Dmytruk N, Billoët A, Antona D, et al. 2011. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). *Clin Microbiol Infect*. 17:1587–1589.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 33(9):2233-9.

Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et al. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(40):13950-5.

Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, et al. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 12391–12396.

Ueno H, Yamamoto Y, Yamamichi A, Kikuchi K, Kobori S, Miyazaki M. 2012. Characterization of Group B *Streptococcus* Isolated from Women in Saitama City, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 65:516-521.

- Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E. 2009. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(2):343-53.
- Wang H, Zhao C, He W, Zhang F, Zhang L, Cao B, *et al.* 2013. High prevalence of fluoroquinolone-resistant group B streptococci among clinical isolates in China and predominance of sequence type 19 with serotype III. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:1538–1541.
- Wang P, Tong J, Ma X, Song F, Fan L, Guo C, *et al.* 2015. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One.* 10: e0120035.
- Wehbeh W, Rojas-Diaz R, Li X, Mariano N, Grenner L, Segal-Maurer S, *et al.* 2005. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae*: epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2495–2497.
- Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:577–585.
- Widdowson CA, Adrian PV, Klugman KP. 2000. Acquisition of chloramphenicol resistance by the linearization and integration of the entire staphylococcal plasmid pC194 into the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 393-5.
- Woodbury RL, Klammer KA, Xiong Y, Bailiff T, Glennen A, Bartkus JM, *et al.* 2008. Plasmid-borne *erm*(T) from invasive, macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 1140-3.
- Wozniak RA and Waldor MK. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 8:552-563.
- Wu H, Janapatla RP, Ho Y, Hung K, Wu C, Yan J, *et al.* 2008. Emergence of fluoroquinolone resistance in group B streptococcal isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1888–1890.
- Zhang A, Yang M, Hu P, Wu J, Chen B, Hua Y, *et al.* 2011. Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. *BMC Genomics.* 12:523.