



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche
XXIII ciclo

Identificazione di geni di oxazolidinone
resistenza e caratterizzazione degli
ambienti genetici in enterococchi di
origine suina isolati in allevamenti della
regione Marche

Dottoranda
Dott.ssa Simona Fioriti

Tutor
Dott. Andrea Brenciani

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Oxazolidinoni.....	5
1.1.1 Linezolid.....	6
1.1.2 Tedizolid.....	7
1.1.3 Meccanismo di azione degli Oxazolidinoni.....	8
1.2 Meccanismi di resistenza.....	12
1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S.....	12
1.2.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22.....	13
1.2.3 I geni <i>cfi</i> e <i>cfi</i> -like.....	17
1.2.3.1 Il gene <i>cfi</i> (B).....	23
1.2.3.2 Il gene <i>cfi</i> (C).....	23
1.2.3.3 Il gene <i>cfi</i> (D).....	27
1.2.3.4 Il gene <i>cfi</i> (E).....	28
1.2.4 Il gene <i>optrA</i>	28
1.2.5 Il gene <i>poxtA</i>	37
1.3 Epidemiologia della resistenza al linezolid.....	42
2. MATERIALI E METODI.....	45
2.1 Campionamento e isolamento degli enterococchi.....	45
2.2 Estrazione del DNA totale.....	46
2.3 Caratterizzazione genotipica e identificazione degli isolati batterici.....	47
2.4 Antibiotici.....	48
2.5 Test di sensibilità.....	48

2.6. Smal-Pulsed Field Gel Electrophoresis e S1-PFGE.....	49
2.7 Saggi di trasferibilità mediante coniugazione.....	50
2.8 Intermedi circolari.....	51
2.9 Southern blotting e ibridazione.....	52
2.10 Sequenziamento e analisi di sequenza.....	53
2.11 Numeri di accesso.....	53
3. RISULTATI.....	55
3.1 Ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti, analisi genotipica e fenotipica.....	55
3.2 Caratterizzazione filogenetica degli isolati enterococcici.....	60
3.3 Localizzazione dei determinanti di resistenza agli oxazolidinoni e instabilità dei contesti genetici.....	70
3.4 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni.....	73
3.5 Analisi dei contesti genetici.....	77
3.5.1 Contesto genetico di <i>optrA</i>	77
3.5.2 Contesti genetici dei geni <i>cfre</i> e <i>cfi(D)</i>	83
3.5.3 Contesto genetico di <i>poxxA</i>	86
4. DISCUSSIONE.....	87
5. BIBLIOGRAFIA.....	93

1. Introduzione

La scoperta degli antibiotici ha segnato una svolta sostanziale nella medicina che ha portato, unitamente al miglioramento delle condizioni igieniche, ad una riduzione della mortalità e morbilità nella popolazione. Lo sviluppo e l'impiego degli antibiotici, a partire dalla seconda metà del XX secolo, ha rivoluzionato l'approccio al trattamento e alla prevenzione delle malattie infettive e delle infezioni permettendo l'evoluzione della medicina moderna. Tuttavia, la comparsa della resistenza agli antibiotici rischia di rendere vane queste conquiste. Negli ultimi anni, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è aumentato notevolmente e ha reso necessaria una valutazione dell'impatto in sanità pubblica, specifica per patogeno, per antibiotico e per area geografica. Ogni microrganismo è infatti causa di malattie di severità e incidenza diversa e nei suoi confronti possono essere disponibili pochi o molti chemioterapici efficaci o anche altre forme di prevenzione primaria come la vaccinazione.

Lo sviluppo di una resistenza è un avvenimento spontaneo ed è ulteriormente favorito dall'assunzione di grandi quantità di antibiotici amplificando notevolmente questo fenomeno di per sé naturale.

Il problema della resistenza agli antibiotici è complesso poiché fondato su molteplici fattori: l'aumentato uso di questi farmaci (incluso l'utilizzo non appropriato) sia in ambito clinico che veterinario, la diffusione delle infezioni ospedaliere da microrganismi antibiotico-resistenti (e il limitato controllo di queste infezioni), un aumento dei viaggi internazionali e quindi una maggiore diffusione dei ceppi.

L'uso continuo degli antibiotici aumenta la pressione selettiva favorendo l'emergere, la moltiplicazione e la diffusione dei ceppi resistenti anche a più antibiotici, i cosiddetti isolati *Multidrug-resistant* (MDR), riducendo ulteriormente la possibilità di un trattamento efficace. Per definizione un microrganismo MDR è in possesso di diversi meccanismi che lo rendono contemporaneamente resistente ad almeno quattro famiglie antibiotiche.

È da sottolineare che questo fenomeno riguarda spesso infezioni correlate all'assistenza sanitaria, che insorgono e si diffondono all'interno di ospedali e altre strutture sanitarie. Oggi questa problematica è diventata una vera e propria priorità di sanità pubblica a livello mondiale, non soltanto per le importanti implicazioni cliniche (aumento della morbilità, letalità, durata della malattia, possibilità di sviluppo di complicanze) ma anche per la ricaduta economica delle infezioni da batteri antibiotico-resistenti, dovuta al costo aggiuntivo richiesto per l'impiego di farmaci e di procedure più costose, per l'allungamento delle degenze in ospedale e per eventuali invalidità.

Istituzioni internazionali come l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) hanno stimato che entro il 2050 le infezioni batteriche causeranno circa 10 milioni di morti all'anno, superando ampiamente i decessi per tumore (8,2 milioni), diabete (1,5 milioni) o incidenti stradali (1,2 milioni) con una previsione di costi che supera i 100 trilioni di dollari.

È ormai noto come in ambito zootecnico i farmaci vengono somministrati non solo ad animali malati per eradicare l'infezione, ma anche per prevenire l'insorgenza di malattie e, in alcuni Paesi, per promuovere la crescita mediante somministrazione massiva di antibiotici negli allevamenti.

Diversi studi hanno evidenziato come l'uso di antibiotici negli allevamenti animali determini un aumento della resistenza agli antimicrobici (Munk *et al.*, 2018). L'insorgenza delle resistenze e l'assenza di nuove molecole efficaci ha un impatto negativo non solo sull'economia dei settori zootecnici e sull'industria alimentare, ma può portare ad una situazione particolarmente preoccupante per gli allevatori visto la loro possibile esposizione ad animali portatori di batteri multiresistenti. Inoltre, sia il consumo di alimenti contenenti batteri antibiotico-resistenti che l'esposizione a coltivazioni contaminate da letame e/o liquami localizzate in prossimità di allevamenti animali può rappresentare un veicolo di trasmissione dagli animali all'uomo.

In ambito ospedaliero, la resistenza agli oxazolidinoni rappresenta oggi la più grave minaccia tra i patogeni Gram-positivi. Il linezolid, primo membro di questa classe di farmaci, viene usato come *last-resort* nel trattamento di gravi infezioni determinate da batteri multi-resistenti come *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente, enterococchi vancomicina-resistenti, pneumococchi e micobatteri multi-resistenti. Inizialmente la resistenza a questo antibiotico era sempre associata a mutazioni, successivamente sono emersi, in isolati di origine sia animale che umana, meccanismi di resistenza trasferibili codificati da geni responsabili della resistenza anche ad altre classi di antibiotici, tra cui i fenicoli.

Numerosi studi hanno evidenziato come i fenicoli, largamente utilizzati in zootecnia, potrebbero esercitare una pressione selettiva in grado di determinare la diffusione della resistenza agli oxazolidinoni in ceppi di origine animale. Un *reservoir* animale di determinanti di resistenza agli oxazolidinoni, potenzialmente trasmissibili a patogeni umani, avrebbe un impatto assai grave sulla salute dell'uomo. Considerando la mancata produzione di nuovi antibiotici da parte delle aziende farmaceutiche, è importante focalizzarsi sulla prevenzione della diffusione di questi geni di resistenza. È quindi essenziale indagare su possibili serbatoi di geni di resistenza al linezolid negli animali da allevamento che potrebbero entrare nella catena alimentare che porta all'uomo.

1.1 Oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni sono una classe di antibiotici caratterizzata dalla presenza di un gruppo 2-ossazolidinone, composto organico eterociclico derivante dall'ossidazione in posizione 2 di un anello ossazolidinico. Negli anni '70 la Upjohn (oggi Pharmacia e Upjohn) mediante un ampio screening evidenziò un gruppo di molecole, appartenenti alla classe degli oxazolidinoni, aventi potere antimicrobico. Purtroppo, la loro elevata tossicità risultante dagli studi negli animali ne impedì l'utilizzo. Negli anni successivi, intorno alla metà degli anni '90, la modificazione chimica di questo gruppo di molecole portò alla

sintesi di due derivati oxazolidinonici non tossici: eperezolid e linezolid (Barbachyn *et al.*, 2011).

In fase preclinica entrambi i composti presentavano stesse caratteristiche in termini di solubilità, spettro d'azione e potere antimicrobico, ma solo il linezolid fu selezionato per la fase clinica II avendo una migliore farmacocinetica. Dopo numerosi trials nel 2000 la *Food and Drug Administration* (FDA) approvò il linezolid per uso clinico, mentre nel 2014 fu approvato e commercializzato un oxazolidinone di seconda generazione: il tedizolid (Zhanel *et al.*, 2015).

1.1.1 Linezolid

Il linezolid è un antibiotico sintetico ad azione batteriostatica, utilizzato in clinica come ultima risorsa per il trattamento di infezioni complicate determinate da batteri Gram-positivi MDR quali: gravi infezioni della pelle e polmoniti nosocomiali indotte da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), batteremie associate a enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) e polmoniti comunitarie determinate da pneumococchi MDR (Bozdogan *et al.*, 2004). Lo Zyvoxid o Zyvox®, nomi commerciali attribuiti al linezolid, è un composto caratterizzato dal gruppo N-ariloxazolidinone fondamentale per esplicitare la sua funzione antibatterica; risulta importante anche la configurazione sterica del C-5 e del gruppo C-5 acilaminometilico dell'anello A. Il gruppo morfolinico e il sostituente fluoro-aromatico in posizione para, sono responsabili sia della migliore farmacocinetica che di una maggiore biodisponibilità del farmaco e risultano essere associati ad una ridotta tossicità del farmaco (Hashemian *et al.*; 2018) (Figura1).

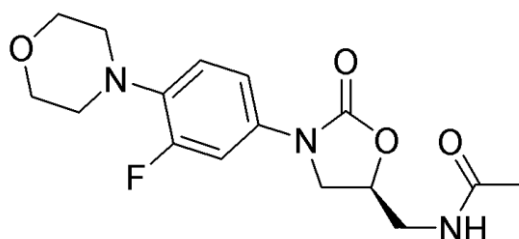


Figura 1 Struttura chimica del linezolid.

Gli studi condotti *in vitro* hanno evidenziato un'attività antimicrobica del linezolid nei confronti dei soli batteri Gram-positivi, con valori di minima concentrazione inibente 50 (MIC₅₀) di 2-4 mg/L sia negli enterococchi che negli stafilococchi (Mendes *et al.*, 2014). Il linezolid risulta essere poco efficiente verso i Gram-negativi, data la presenza di pompe di efflusso che ne riducono l'efficacia (Schumacher *et al.*, 2007). Il linezolid viene utilizzato in ambito clinico mediante somministrazione orale o parenterale, e la dose consigliata è pari a 600 mg ogni 12 ore (Diekema *et al.*, 2001). È stato osservato che l'uso prolungato dell'antibiotico può determinare la comparsa di effetti collaterali. La gravità e l'entità di tali effetti dipende dalla durata temporale dell'assunzione del farmaco, si possono infatti riscontrare trombocitopenia e anemia dopo un'assunzione del farmaco per 4 e/o 6 settimane e neuropatie quando la somministrazione si protrae per più di 6 mesi (Bozdogan *et al.*, 2004).

1.1.2 Tedizolid

La presenza di possibili effetti collaterali indotti dall'uso prolungato del linezolid e lo sviluppo di ceppi resistenti hanno velocizzato la sintesi di nuovi oxazolidinoni capaci di ovviare a queste problematiche. Il tedizolid (Sivextro®), precedentemente indicato come Torezolid, è il primo oxazolidinone di seconda generazione in grado di inibire la crescita di batteri che hanno sviluppato resistenza al linezolid. Chimicamente il composto presenta delle differenze rispetto al Linezolid, quali: (i) un gruppo metilico nel C₅ dell'anello A che rimpiazza il gruppo acil-amino-metilico; (ii) l'inserimento di un anello D che induce maggior stabilità di legame al sito bersaglio (Rybak *et al.*, 2015) (Figura 2).

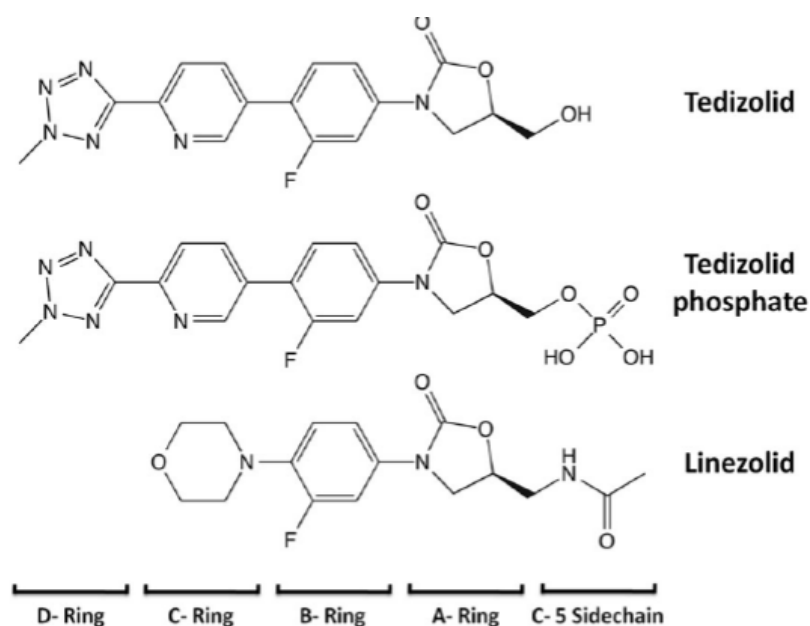


Figura 2. Struttura chimica del tedizolid, tedizolid-fosfato e linezolid a confronto.

Il tedizolid possiede inoltre un'emivita maggiore rispetto al linezolid, il che ne permette una somministrazione giornaliera, orale o parenterale, a dosi più basse (200 mg/die), ma soprattutto non sembra determinare effetti collaterali legati a trombocitopenia e anemia come precedentemente osservato per somministrazioni prolungate di linezolid. Il tedizolid è assunto come profarmaco fosforilato, forma che ne aumenta la biodisponibilità e la solubilità in acqua. Raggiunto il circolo ematico viene defosforilato dalle fosfatasi sieriche in questo modo il tedizolid può esplicare la sua funzione antimicrobica (Rybak *et al.*; 2015). Studi condotti *in vitro* evidenziano che il tedizolid è più efficace del linezolid, infatti il valore di MIC₅₀ è quattro/otto volte inferiore rispetto a quella del linezolid nei confronti sia degli stafilococchi che degli enterococchi (Zhanel *et al.*, 2015). Tutti questi aspetti fanno del tedizolid un'ottima opzione terapeutica nel trattamento di infezioni gravi determinate da batteri Gram-positivi multiresistenti.

1.1.3 Meccanismo di azione degli Oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni esplicano la loro azione antimicrobica inibendo la sintesi proteica batterica. Kloss *et al.* nel 1999, eseguirono il primo studio sul meccanismo d'azione degli

oxazolidinoni, riferendosi in particolare modo al linezolid e identificando come target dell'antibiotico il centro della peptidiltrasferasi (PTC) della subunità 50S del ribosoma batterico (Kloss *et al.*, 1999). Successivi studi cristallografici condotti sul complesso linezolid/subunità ribosomale 50S di *Haloarcula marismortui* –organismo appartenente al dominio degli *Archea* avente una singola copia genica dell'rRNA 23S (così da superare il problema della ridondanza degli operoni per gli RNA ribosomiali)– e del batterio *Deinococcus radiodurans* (Long *et al.*, 2012) permisero di chiarire ulteriormente il sito di legame del farmaco nel ribosoma batterico: il linezolid, legandosi al sito A nel centro della peptidiltrasferasi, era in grado di determinare il blocco delle fasi iniziali della traduzione (Figura 3).

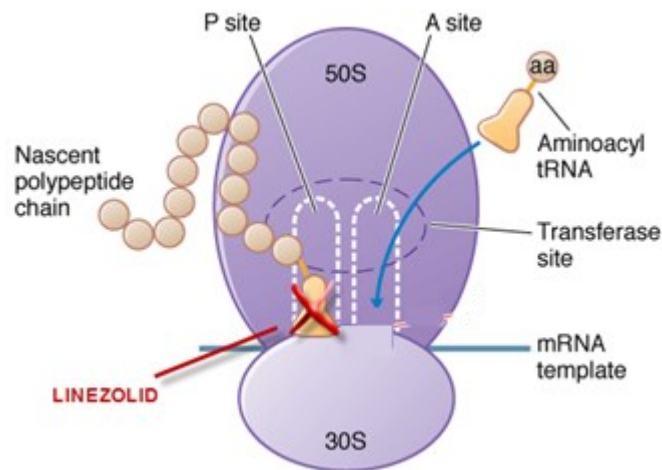


Figura 3. Interazione del linezolid con il ribosoma batterico.

Ulteriori analisi cristallografiche hanno evidenziato che il legame del linezolid alla subunità 50S del ribosoma batterico induce dei cambiamenti nella posizione di alcuni nucleotidi, come ad esempio U2585, un nucleotide conservato e indispensabile per il corretto posizionamento del tRNA nel sito P (Figura 4).

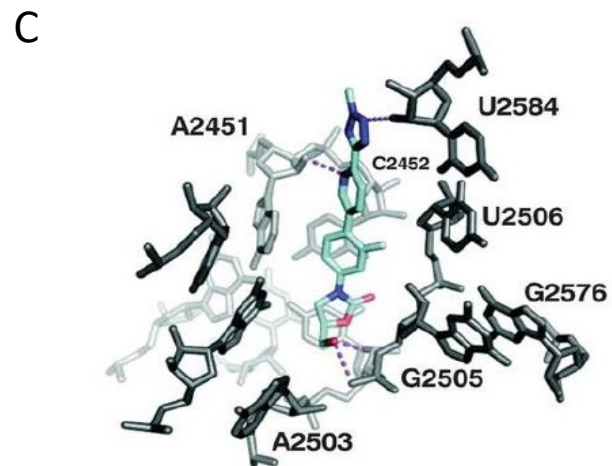
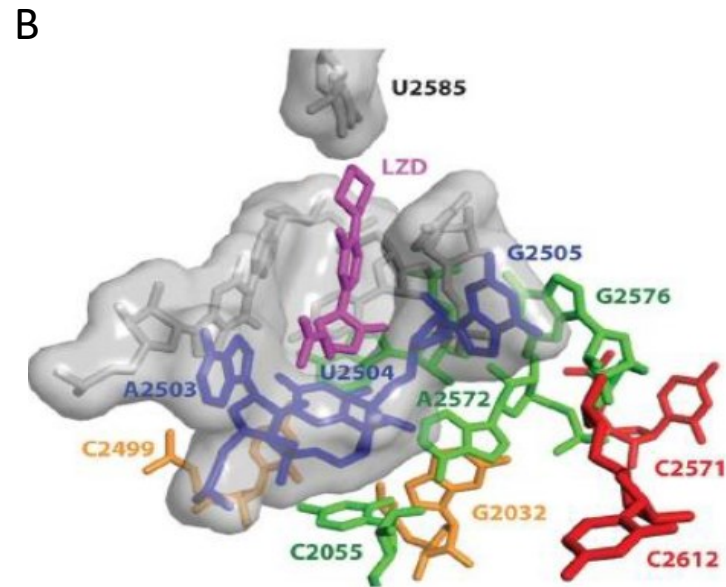
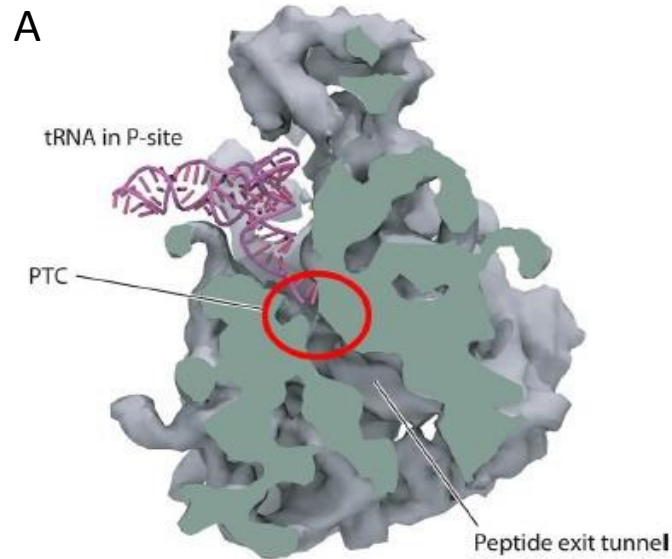


Figura 4:

- Sezione sagittale della subunità 50S del ribosoma in cui è visibile il legame del tRNA (in viola) legato al sito P; la PTC è identificata del cerchio rosso. Tratto da Long *et al.*, 2012.
- Sito di legame del linezolid; i nucleotidi che partecipano al legame con l'antibiotico vengono indicati con colori diversi. In blu, i nucleotidi più prossimi al sito di legame del linezolid (A2503, U2504, G2505); in rosso, verde e arancio, quelli più lontani. Tratto da Long *et al.*, 2012.
- Sito di legame del Tetrizolid nel PTC. I legami idrogeno fondamentali sono indicati da linee tratteggiate viola. Tratto da Shaw *et al.*, 2008.

Successivamente, Wilson e collaboratori suggerirono un ulteriore modello riguardante il meccanismo d'azione degli oxazolidinoni che prevede l'idrolisi del guanositri-fosfato con rilascio del fattore Ef-Tu (fattore di elongazione termo-instabile) e conseguente blocco dell'accesso del tRNA al sito A con dissociazione del complesso ribosomiale (Figura 5) (Wilson *et al.*, 2008).

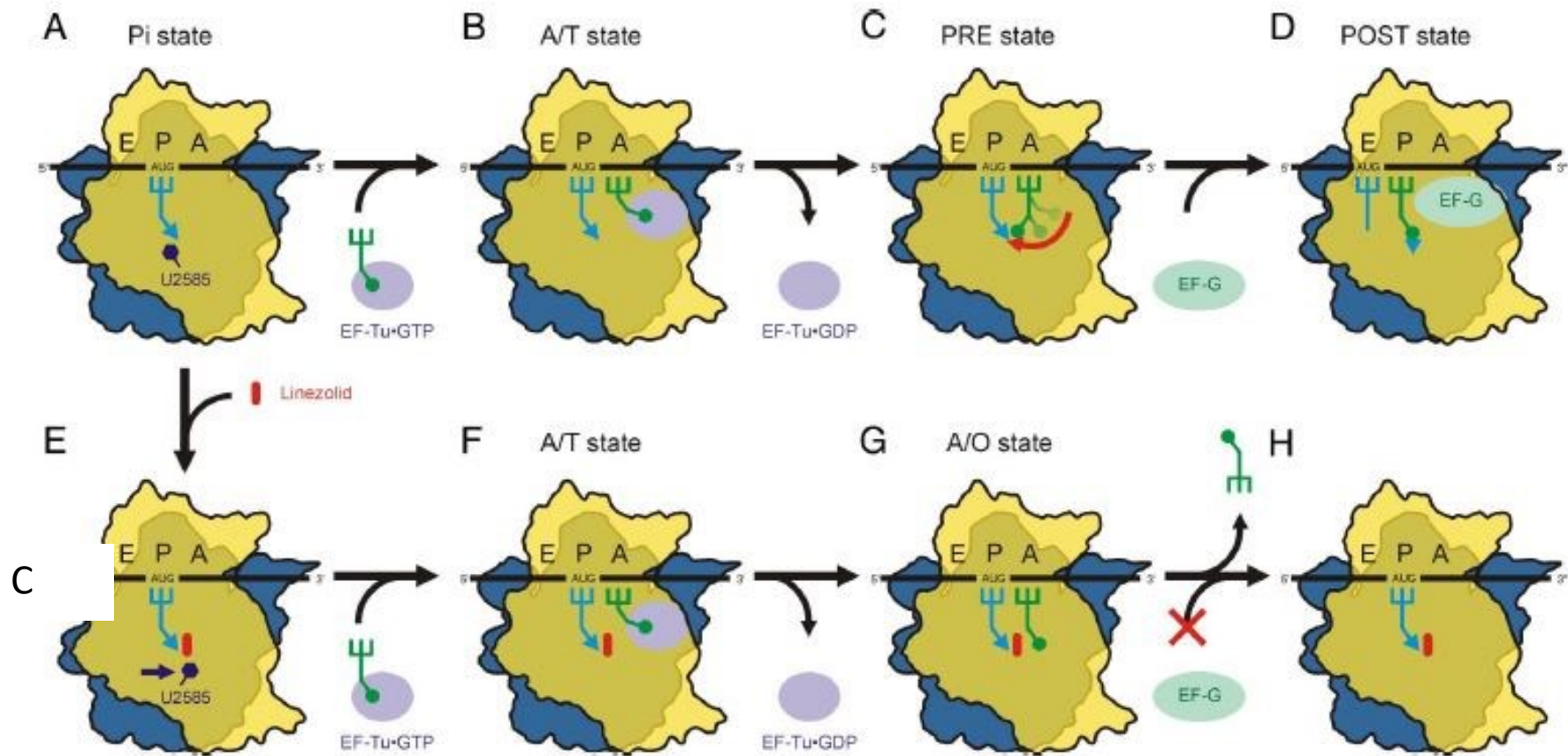


Figura 5. La figura illustra l'attività inibitoria degli oxazolidinoni durante la traduzione. (A-D) eventi durante la normale traduzione, (E-H) eventi in presenza di oxazolidinoni (rosso).

1.2 Meccanismi di resistenza

I primi ceppi resistenti al linezolid iniziano ad apparire dopo un anno dalla sua approvazione da parte della FDA. La resistenza viene inizialmente segnalata in *Enterococcus faecium* (Gonzales *et al.*, 2001), poi in *Staphylococcus aureus* (Tsiodras *et al.*, 2001) e successivamente anche negli stafilococchi coagulasi negativi (Kelly *et al.*, 2006) e in *Streptococcus pneumoniae* (Wolter *et al.*, 2005).

Nel corso degli anni si sono sviluppati differenti meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni: (i) comparsa di mutazioni in corrispondenza dell'rRNA 23S e/o delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22; (ii) meccanismi di resistenza trasferibili codificati da geni acquisiti mediante trasferimento genico orizzontale.

1.2.1 Mutazioni dell'rRNA 23S

Il PTC, presente nel dominio V dell'rRNA 23S della subunità 50S del ribosoma procariotico, consta di alcuni nucleotidi altamente conservati come G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585 (numerazione riferita ad *Escherichia coli*) che interagiscono direttamente con il linezolid e tedizolid (Wilson *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2020). I fenomeni mutazionali coinvolgono sia i nucleotidi che interagiscono direttamente con gli oxazolidinoni (G2061, A2503, U2504 e G2505) che nucleotidi più lontani dal sito di interazione (A2062, G2447, A2453 e G2576) (Figura 6).

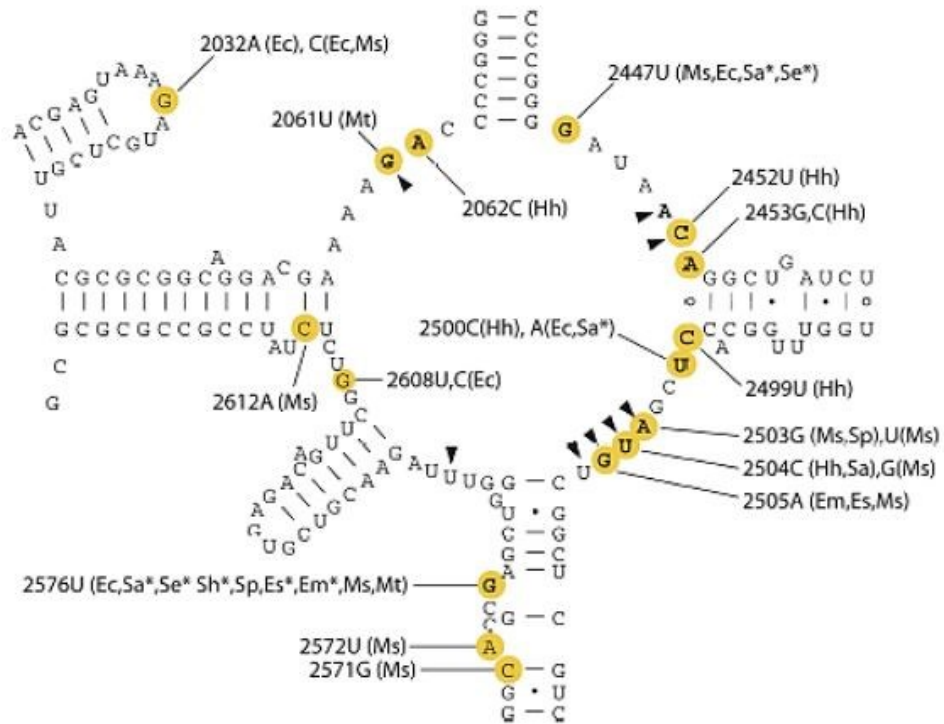


Figura 6. Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA 23S (sequenza nucleotidica riferita a *Mycobacterium smegmatis*, numerazione riferita a *E. coli*). Le frecce nere indicano i nucleotidi che interagiscono direttamente con il linezolid. Evidenziati da cerchi gialli sono riportati i nucleotidi che vanno incontro a mutazioni, quelli in grassetto rappresentano mutazioni in grado di indurre un considerevole incremento della MIC di linezolid (>4 volte). Le mutazioni e gli organismi corrispondenti sono indicate con due lettere: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*Staphylococcus epidermidis*), Sh (*Staphylococcus haemolyticus*), Sp (*Streptococcus pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*M. smegmatis*), Mt (*Mycobacterium tuberculosis*), Hh (*Halobacterium halobium*). Gli asterischi indicano mutazioni descritte in ceppi di isolamento clinico.

Numerosi studi hanno evidenziato che la mutazione G2576U è la più diffusa tra isolati di stafilococco ed enterococco (Long *et al.*, 2012) e la sua insorgenza sembra essere associata ad un prolungato trattamento o ad un dosaggio eccessivo del farmaco.

Successivamente, Marshall e collaboratori hanno evidenziato la presenza di una stretta correlazione tra il numero di alleli mutati nell'rRNA 23S e il livello di resistenza al linezolid (Marshall *et al.*, 2002).

È stato inoltre documentato come le stesse mutazioni in corrispondenza del PTC determinino una cross-resistenza ad altri antibiotici che hanno lo stesso sito di legame, come nel caso della mutazione G2576U che conferisce resistenza anche al cloramfenicolo (Long *et al.*, 2010).

Un recente studio ha evidenziato la prima mutazione non ribosomica, indotta *in vitro*, in grado di determinare resistenza agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid) in un ceppo di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (Shen *et al.*, 2021).

L'alterazione nucleotidica è stata evidenziata nel gene *rpoB* (A1345G, corrispondente alla sostituzione aminoacidica D449N della proteina RpoB), codificante la subunità β della RNA polimerasi, e in grado di conferire non solo la resistenza agli oxazolidinoni, ma anche ai fenicoli, retapamulina e quinupristin/dalfopristin (Shen *et al.*, 2021).

1.2.2 Mutazioni delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22

Un altro meccanismo che determina una ridotta sensibilità al linezolid riguarda la comparsa di mutazioni nei geni *rplC*, *rplD* e *rplV* codificanti le proteine ribosomiali rispettivamente L3, L4 e L22.

Una regione della proteina ribosomiale L3 si posiziona sulla superficie della subunità 50S protraendosi, tramite una struttura a loop, all'interno del PTC. Anche parte della proteina L4 è localizzata in prossimità del PTC ma nel tunnel attraverso il quale i peptidi nascenti escono dal ribosoma (Long *et al.*, 2012) (Figura 7).

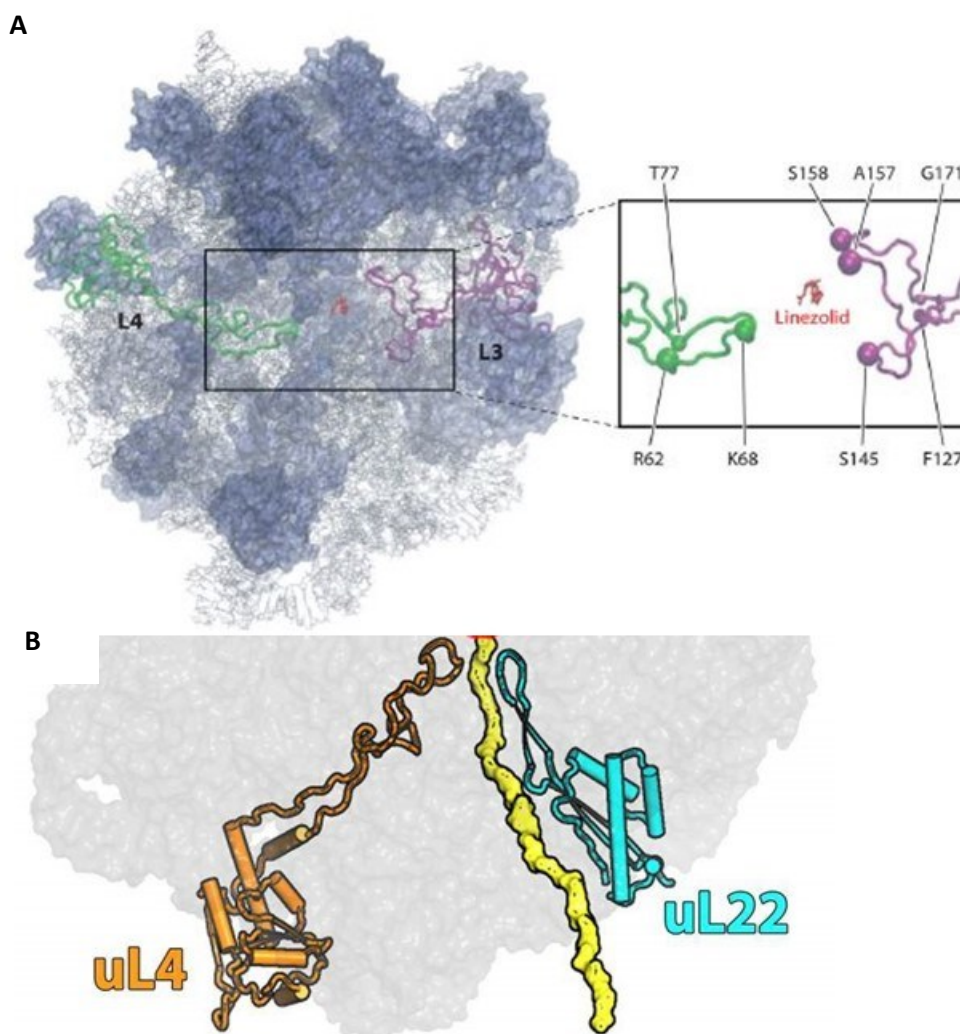


Figura 7. A) Rappresentazione delle proteine ribosomiali L3 (in viola) e L4 (in verde) in corrispondenza del PTC sito di legame del linezolid (in rosso). B) Rappresentazione della proteina ribosomiale L22 (in azzurro) all'interno del complesso ribosomiale. In arancione la proteina L4 e in giallo la catena polipeptidica nascente.

Alterazioni a carico delle proteine L3 e L4, in grado di determinare una ridotta sensibilità al linezolid, sono state riportate in numerosi isolati, sia da sole che in associazione con altri meccanismi di resistenza (Tabella 1) (Long *et al.*, 2012). Successivi studi hanno evidenziato che la maggior parte delle mutazioni erano localizzate nella proteina L3 (le più comuni sono F147L e A157R) (Long *et al.*, 2012) (Tabella 1), molto probabilmente per via della maggiore vicinanza di tale proteina al sito PTC. È stato inoltre mostrato che le mutazioni in L3 possano avere un effetto compensatorio in termini di fitness in isolati che presentano mutazione G2576U nell'rRNA 23S (Billal *et al.*, 2011).

Il reale contributo delle mutazioni a carico della proteina L4 non è stato del tutto chiarito. Tali alterazioni sono sempre state riscontrate in concomitanza con altre mutazioni in L3 o in associazione ad altri meccanismi di resistenza, come mostrato in tabella 1. Alcuni studi evidenziano la presenza di inserzioni e/o delezioni nel gene *rpD* e sottolineano come questi eventi mutazionali siano probabilmente correlati alla ridotta sensibilità al linezolid. (Long *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2014). Wolter *et al.* dimostrarono che le delezioni 65WR66 e 68KG69 nella proteina L4 erano in grado di conferire resistenza al linezolid in due ceppi di *Streptococcus pneumoniae* (Wolter *et al.*, 2005).

Sono state identificate mutazioni anche a carico del gene *rpV*, codificante la riboproteina L22, quali: A29V, N56D, S77T (Shore *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2017). Al momento ci sono pochi dati riguardanti l'effettivo contributo di queste sostituzioni nella resistenza agli oxazolidinoni, tuttavia si presume che la loro vicinanza al PTC possa giocare un ruolo determinante sul fenotipo di resistenza. (Long *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013).

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

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

^a Distanza degli amminoacidi mutati dal sito bersaglio del linezolid (riferimento numerico della proteina L3 di *D. radiodurans*).

^b Distanza tra linezolid e i corrispondenti amminoacidi di *D. radiodurans*.

^c Informazioni aggiuntive. C, isolato clinico; T, trattamento con linezolid; cfr, presenza del gene *cfr*; RE, evidenza di resistenza. Altre mutazioni sono indicate con le corrispondenti posizioni nell'rRNA 23S, in L3 e L4 di *E. coli*.

^d — L3-L101V, che non influenza la resistenza al linezolid.

^e — L4-N158S, che non influenza la resistenza al linezolid.

^f Nessun dato sugli allineamenti è disponibile

1.2.3 I geni *cfr* e *cfr-like*

Il determinante di antibiotico-resistenza *cfr* (*cloramphenicol and florfenicol resistance*) è il primo meccanismo di resistenza al linezolid trasferibile ad essere stato identificato, in un isolato di *Staphylococcus sciuri* di origine animale e che era in grado di conferire resistenza a cloramfenicolo e florfenicolo (Schwarz *et al.*, 2000). Kehrenberg *et al.* hanno evidenziato una localizzazione plasmidica del gene *cfr* (plasmide di 17.1 kb denominato pSCFS1) ove risultava essere associato ad altri geni di antibiotico-resistenza (Figura 8) (Kehrenberg *et al.*, 2004).

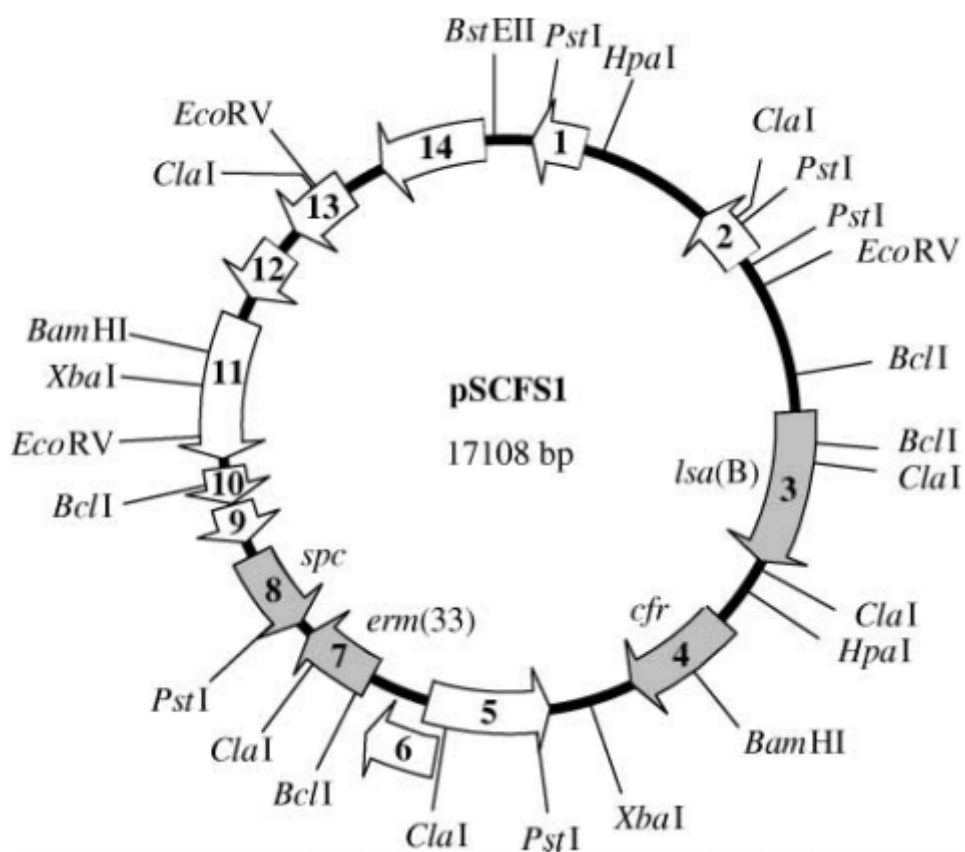


Figura 8. Rappresentazione schematica del plasmide pSCFS1 di *Staphylococcus sciuri*. Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni, i determinanti di antibiotico-resistenza sono rappresentati da frecce grigie.

Successivi studi hanno dimostrato in dettaglio il meccanismo d'azione del gene *cfr*. Questo determinante di resistenza codifica una metiltrasferasi in grado di aggiungere un

gruppo metile al C₈ dell'adenina in posizione 2503 dell'rRNA 23S (Kehremberg *et al.*, 2005) (Figura 9).

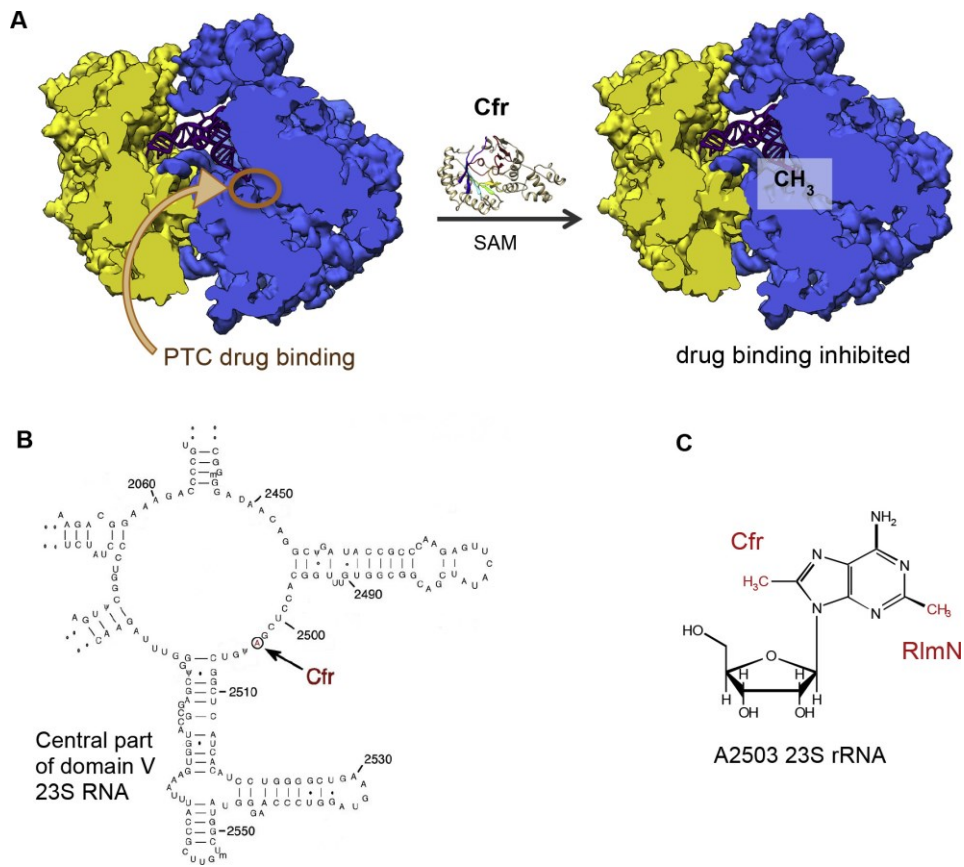


Figura 9. Sito di metilazione nel ribosoma da parte di Cfr. A) Sezione trasversale del ribosoma di *E. coli* con il tRNA nel sito P, il cerchio rosso indica il PTC. A fianco, il ribosoma di *E. coli* con metilazione della base A2503. B) Struttura a forcina della parte centrale del dominio V del RNA 23S, la freccia indica la base A2503 che viene metilata da Cfr. C) Struttura chimica della base A2503 con doppia metilazione, in rosso sono mostrati gli enzimi che mediano l'aggiunta del gruppo metile.

La metilazione in A2503 conferisce cross-resistenza a cinque differenti classi di antibiotici che hanno come bersaglio siti contigui ma non identici nel PTC: fenicoli, lincosamidi, oxazolidinoni, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A, il fenotipo che ne risulta è denominato PhLOPS_A (Long *et al.*, 2006). Tuttavia, la metilazione mediata dalla proteina Cfr non determina la resistenza al tedizolid poiché la base A2503 non è direttamente coinvolta nel legame con questo antibiotico (Figura 10).

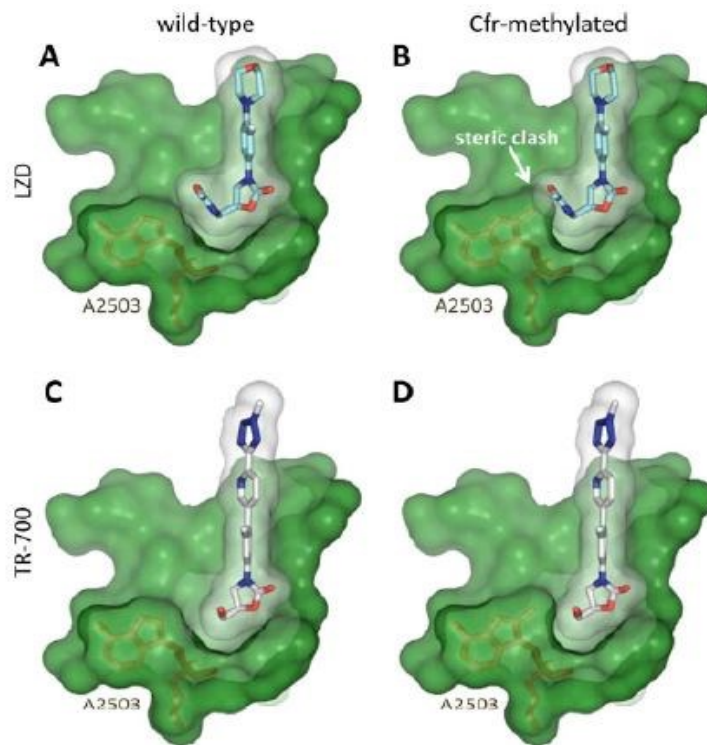


Figura 10. Analisi cristallografica delle strutture ribosoma/oxazolidinone in presenza della metilazione indotta da *cfr*. A-b) Legame linezolid-subunità 50S in assenza e in presenza di metilazione. C-D) Legame tedizolid-subunità 50S in assenza e in presenza di metilazione.

Smith *et al.*, hanno successivamente mostrato che il gene *cfr*, oltre a determinare il fenotipo PhLOPS_A, era responsabile di significativi livelli di resistenza ai macrolidi con anelli a 16 atomi di carbonio come la spiramicina (Smith *et al.*, 2008). È stato inoltre dimostrato che il gene *cfr* induce un basso costo di fitness pertanto può essere mantenuto nella popolazione batterica anche in assenza di pressione selettiva (LaMarre *et al.*, 2011).

Nonostante la localizzazione più frequente del gene *cfr* sia quella plasmidica, sono state anche descritte posizioni cromosomiche del determinante di resistenza (Toh *et al.*, 2007). È interessante notare come il determinante sia frequentemente associato a geni codificanti proteine di mobilizzazione quali le IS (*Insertion Sequences*) che ne consentono l'integrazione in diversi contesti genetici e quindi una maggiore diffusione in specie batteriche differenti (Shen *et al.*, 2013). Numerosi studi hanno tuttavia evidenziato come il gene *cfr* sia più diffuso nel genere *Staphylococcus spp* in ceppi di origine umana che animale (Figura 11).

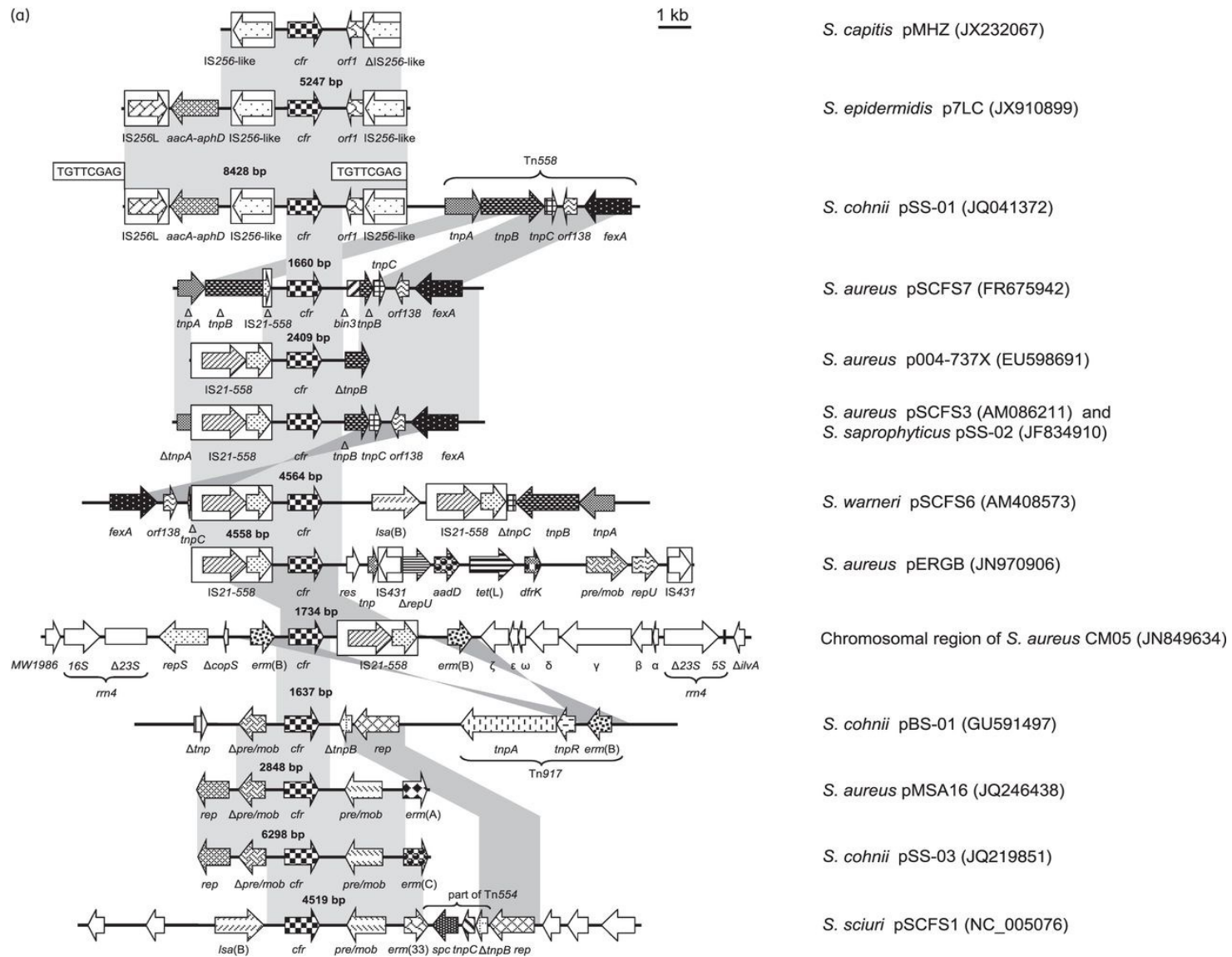


Figura 11. Comparazione dei contesti genetici, plasmidici e cromosomici, del gene *cfr* in *Staphylococcus* spp.

È interessante notare come spesso il *cfrr* risulta essere associato ad altri geni di resistenza, ciò potrebbe ulteriormente garantire la permanenza del determinante nella popolazione batterica anche grazie ad agenti antimicrobici diversi da quelli del fenotipo PhLOPS_A (Shen *et al.*, 2013).

Dalla sua scoperta il gene *cfrr* è stato ad oggi indentificato in sei generi Gram-positivi (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Macroccoccus*, *Bacillus*, *Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) e 4 generi Gram-negativi (*Proteus*, *Escherichia*, *Morganella* e *Pasteurella*) (Shen *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2019, Chen *et al.*, 2020).

Nel 2010 è stato segnalato il primo plasmide *cfrr*-positivo in un ceppo di *E. faecalis* di origine animale in Cina (Liu *et al.*, 2012). La caratterizzazione genetica del plasmide, denominato pEF-01, ha evidenziato la presenza di un gene *cfrr* codificante una proteina che differiva di due aminoacidi rispetto alla metilasi *wild-type* e tre copie di IS1216, molto diffuse nella specie enterococcica, che risultano essere responsabili della disseminazione del determinante di resistenza. Nello stesso anno è stato anche isolato il primo *E. faecalis* di origine clinica *cfrr*-positivo e resistente al linezolid (Diaz *et al.*, 2012). Il contesto del gene *cfrr*, localizzato su un plasmide coniugativo di circa 100 kb, mostrava sequenze di DNA simili a quelle di altri plasmidi *cfrr* precedentemente identificati negli stafilococchi ma contrariamente da quanto osservato in pEF-01 conteneva IS256 (Diaz *et al.*, 2012).

Da allora, sono stati descritti solo pochi enterococchi *cfrr*-positivi (Figura 12), i contesti genetici mostravano una localizzazione quasi esclusivamente plasmidica (Shen *et al.*, 2013) e presentavano un'enorme variabilità genetica. È interessante notare come tutti i plasmidi enterococcici contenenti il gene *cfrr* fino ad ora caratterizzati mostrino caratteristiche comuni: (i) sono strutture a mosaico, probabilmente risultato di eventi di ricombinazione plasmidica; (ii) sono presenti IS1216 o altre IS, appartenenti alla famiglia delle IS6, responsabili della diffusione del determinante di resistenza (Liu *et al.*, 2012; Di Sante *et al.*, 2017).

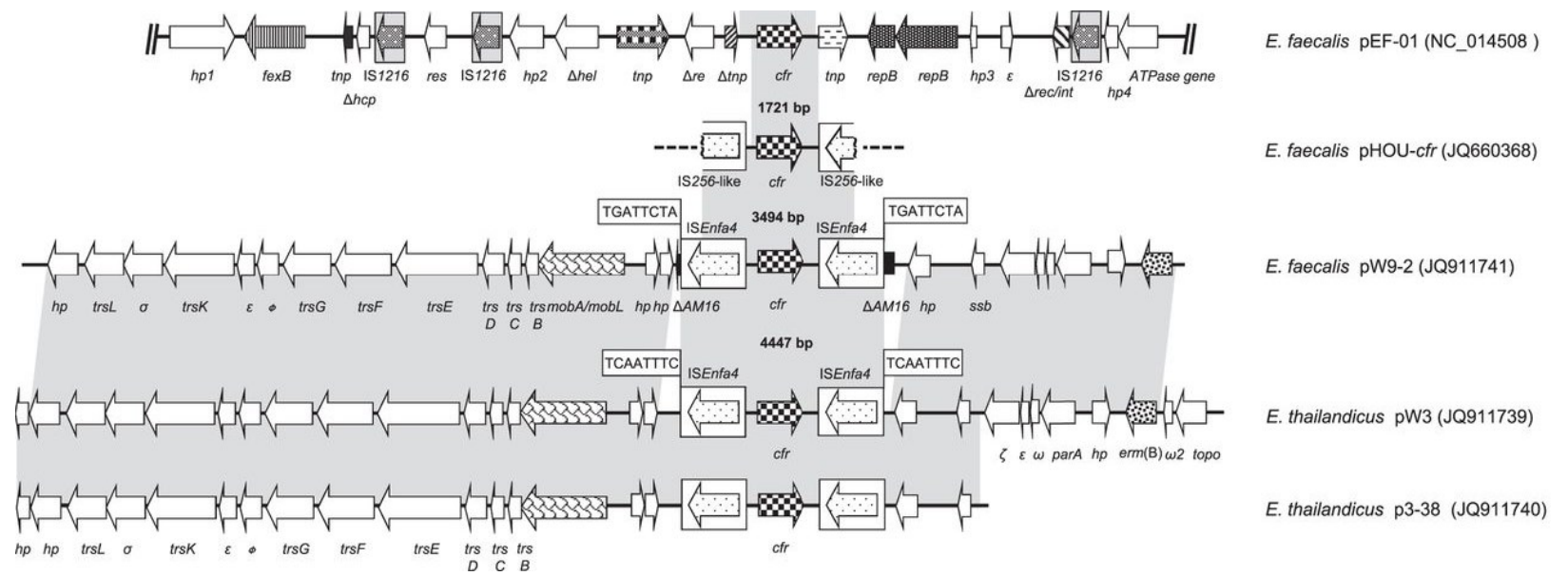


Figura 12. Comparazione dei contesti genetici plasmidici del gene *cfr* in *Enterococcus* spp.

Ad oggi sono state identificate cinque varianti del gene *cfr*: *cfr*(B), *cfr*(C), *cfr*(D) e *cfr*(E).

1.2.3.1 Il gene *cfr*(B)

Molti anni dopo la scoperta del gene *cfr*, Marin *et al.* identificarono sette ceppi di *Clostridioides difficile* di origine umana con alti livelli di resistenza al linezolid contenenti il gene *cfr* (Marin *et al.*, 2015). Tuttavia, l'analisi di sequenza del *cfr* clostridiale mostrava una identità amminoacidica del 75% con la proteina *wildtype* di *S. sciuri* (Schwarz *et al.*, 2015) suggerendo la presenza di un nuovo meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni. Studi successivi hanno evidenziato questa nuova variante, denominata *cfr*(B), in due isolati clinici di *E. faecalis* che mostravano un fenotipo di multiresistenza tra cui elevati valori di MIC al linezolid (Desphande *et al.*, 2015). Nello stesso studio *cfr*(B) è stato clonato per valutarne la funzionalità, i risultati ottenuti hanno dimostrato chiaramente che il gene era in grado di conferire resistenza a linezolid, cloramfenicolo, clindamicina, retapamulina, quinupristin-dalfopristin, e virginiamicina inducendo il fenotipo PhLOPS_A come precedentemente osservato per la metilasi prodotta dal gene *cfr*. (Desphande *et al.*, 2015). Ad oggi il gene *cfr*(B) è stato identificato in *C. difficile*, *E. faecalis* e *E. faecium* sia in ceppi di origine umana che animale (Bender *et al.*, 2015, Kuroda *et al.* 2018, Dingle *et al.*, 2014). È interessante notare come in tutti gli isolati il determinante di antibiotico resistenza sia localizzato su di un trasposone cromosomico non coniugativo, appartenente alla famiglia del Tn₉₁₆, denominato Tn₆₂₁₈ (Figura 13). Un successivo studio ha per la prima volta evidenziato una localizzazione plasmidica del trasposone Tn₆₂₁₈ in due isolati clinici di *E. faecium* identificati in Germania. (Bender *et al.*, 2016).

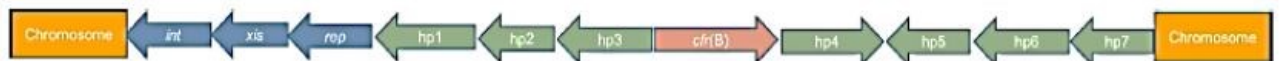


Figura 13. Rappresentazione schematica del trasposone Tn₆₂₁₈.

1.2.3.2 Il gene *cfr*(C)

Nel 2017 Tang *et al.* hanno identificato un nuovo gene *cfr*, denominato *cfr*(C), in ceppi di *Campylobacter coli* isolati da campioni fecali di allevamenti di bestiame statunitensi. I

ceppi, oltre ad essere resistenti a diverse classi di antibiotici, avevano valori di MIC di florfenicolo pari a 32 mg/L, un valore raramente riportato in *Campylobacter*. La proteina Cfr(C) mostrava un'elevata somiglianza con gli enzimi della superfamiglia S-adenosilmetionina ed aveva un'identità amminoacidica del 55,1% con la proteina Cfr di *S. sciuri* e del 54,9% e con Cfr(B) di *E. faecium* (Tang *et al.*, 2017). Studi funzionali hanno evidenziato che il determinante era in grado di conferire resistenza a fenicoli, lincosamidi, pleuromutiline e oxazolidinoni. Lo stesso studio ha mostrato che *cfr(C)* era localizzato su un plasmide coniugativo di 48 kb, denominato pTx40, ed era associato ai geni *tet(O)*, responsabile della resistenza alla tetraciclina e *aphA*, responsabile della resistenza agli aminoglicosidi (Tang *et al.*, 2017) (Figura 14).

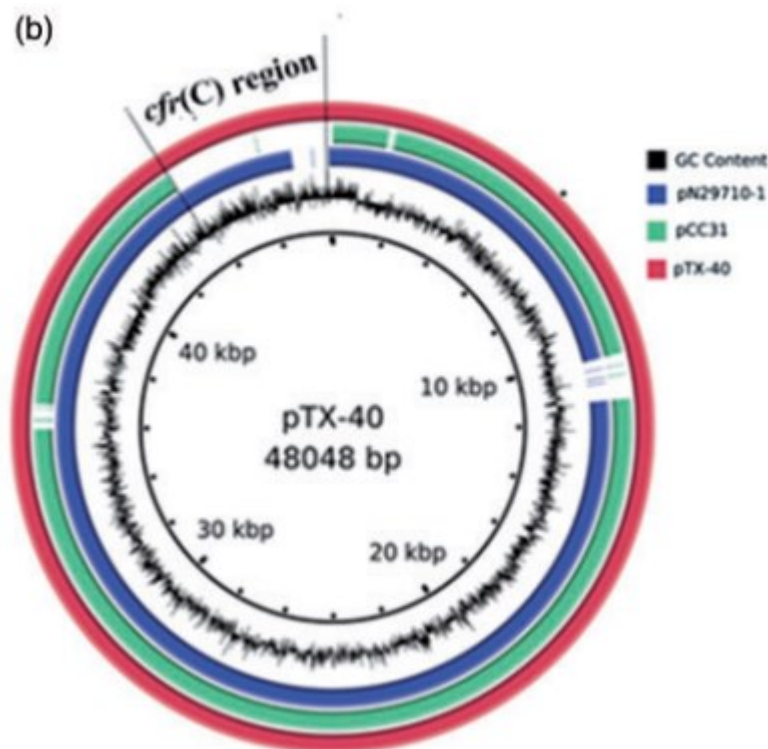


Figura 14. Rappresentazioni circolari del plasmide pTx40, pCC31 e pN29710-1. Le sequenze del plasmide pTx40 mancanti negli altri due plasmidi sono rappresentate da spazi vuoti nel corrispondente cerchio.

Seguirono altri studi che portarono all'identificazione di varianti del gene identificate in isolati di *C. coli* di origine animale in Cina; le analisi di sequenza mostravano variazioni da due a sei amminoacidi rispetto all'originale Cfr(C) riportato negli USA (Tabella 2) (Liu *et*

al., 2019; Tang *et al.*, 2020). Liu *et al.* dimostrarono che le varianti non erano funzionali nel background genetico di *C. coli* (bassi valori di MIC ai fenicoli), mentre erano in grado di conferire resistenza ai fenicoli in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (Liu *et al.*, 2019). È interessante notare che le varianti *cfv*(C) sono localizzate su isole genomiche cromosomiche di multiresistenza contenenti numerosi geni di resistenza agli antibiotici di origine Gram-positiva (Liu *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2020). Il gene *cfv*(C) è stato anche trovato in batteri Gram-positivi anaerobi come *C. difficile* e *Clostridium bolteae* ed era localizzato su *Integrative and Conjugative Element* (ICE) cromosomiche (Candela *et al.*, 2017).

Tabella 2. Varianti amminoacidiche di CfrC in isolati di *Campylobacter spp.*

Sequenza		Localizzazione ^b	Isolato					Referenza
Variante ^a	Sostituzione amminoacidica		Specie	Anno di isolamento	Fonte ^c	Sequence Type	MIC di linezolid mg/L	
Wild type		p	<i>C. coli</i>	2017	a	ST1068	128	Tang <i>et al.</i> , 2017
K	E94K	c	<i>C. difficile</i> DA00154	2010	h	nr ^d	nr ^d	Candela <i>et al.</i> , 2017
KV	T225K, I318V	c	<i>C. coli</i> SHP35	2015	a	ST7426	16	Liu <i>et al.</i> , 2019
KV	T225K, I318V	c	<i>C. coli</i> SHP37	2015	a	ST7426	16	Liu <i>et al.</i> , 2019
RV	K178R, I318V	c	<i>C. coli</i> SHP40	2015	a	ST828	32	Liu <i>et al.</i> , 2019
SMQKRV	R15S, I134M, K178Q, T225K, P298R, I318V	c	<i>C. coli</i> SHP63	2015	a	ST854	16	Liu <i>et al.</i> , 2019
	ΔF247-S379	c	<i>C. coli</i> JP10	2018/19	a	ST854	8	Tang <i>et al.</i> , 2020
RQ	K178R, R240Q	c	<i>C. coli</i> JZ_1_53	2018/19	a	ST5947	8	Tang <i>et al.</i> , 2020
RQ	K178R, R240Q	c	<i>C. coli</i> JZ_1_74	2018/19	a	ST5947	128	Tang <i>et al.</i> , 2020
ARV	E94A, K178R, I318V	p	<i>C. coli</i> JZ_1_79	2018/19	a	ST1058	128	Tang <i>et al.</i> , 2020
AR	E94A, K178R	c	<i>C. coli</i> JZ_2_24	2018/19	a	ST828	128	Tang <i>et al.</i> , 2020
RQ	K178R, R240Q	P	<i>C. coli</i> SH89	2018/19	a	ST828	128	Tang <i>et al.</i> , 2020
ARV	E94A, K178R, I318V	p	<i>C. coli</i> SH96	2018/19	a	ST1450	128	Tang <i>et al.</i> , 2020

^a Variante: le sostituzioni amminoacidiche sono descritte utilizzando il codice a singola lettera. Sostituzione: sostituzione amminoacidica e relativa posizione.

^b Localizzazione: p plasmidica, c cromosomica

^c Fonte di isolamento: h umana, a animale

^d nr: dato non riportato

1.2.3.3 Il gene *cfr*(D)

Il gene *cfr*(D) è stato identificato per la prima volta nel 2015 in un isolato clinico di *E. faecium* linezolid-resistente (Sassi *et al.*, 2019) e successivamente trovato in un ceppo di *E. faecium* isolato da emocoltura di un paziente australiano (Pang *et al.*, 2019). Successive analisi genomiche hanno evidenziato *cfr*(D) su due plasmidi coniugativi rispettivamente di 11 kb (plasmide 2) e 103 kb (plasmide 4). L'analisi del contesto genetico ha mostrato la presenza del gene *guaA* che codifica una guanosina monofosfato sintetasi (troncata da una *IS1216* nel plasmide 2) a valle del gene *cfr*(D) a sua volta fiancheggiato da *IS1216* che sembrano essere implicate nella mobilizzazione del gene (Figura 15) (Guerin *et al.*, 2020).

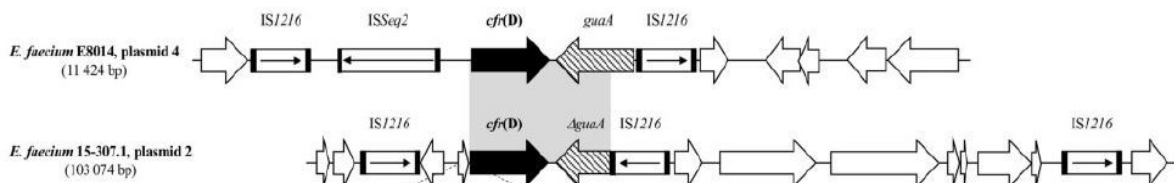


Figura 15. Rappresentazione schematica del contesto genetico di *cfr*(D). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati da frecce nere. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica > 99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *cfr*(D) e gli isolati (a destra).

cfr(D) codifica una proteina di 357 aminoacidi che mostra un'identità amminoacidica del 64% con Cfr e Cfr(B) e del 48% con Cfr(C). La funzionalità del gene *cfr*(D) è stata studiata mediante clonaggio: il nuovo determinante era in grado di conferire il fenotipo di resistenza PhLOPS_A solo in *Escherichia coli*, mentre in *E. faecalis* e in *E. faecium* si è dimostrato non funzionale. Sulla base di questi esperimenti gli autori hanno suggerito che la mancata resistenza agli oxazolidinoni e ai fenicoli, nel background enterococcico, poteva essere attribuita ad un problema di natura specie-specifico, probabilmente correlato alla struttura dei ribosomi; gli stessi autori sottolineano come gli enterococchi potrebbero costituire un serbatoio per il determinante resistenza (Guerin *et al.*, 2020).

1.2.3.4 Il gene *cfr*(E)

Un nuovo *cfr*-like, denominato *cfr*(E), è stato recentemente scoperto in un ceppo di *C. difficile* con alti livelli di resistenza al linezolid e isolato da un paziente di 3 anni con diarrea in un nosocomio messicano (Stojkovic *et al.*, 2019). L'analisi BLASTP della proteina Cfr(E) mostrava un'identità di sequenza amminoacidica compresa fra il 51 e il 58% con le altre proteine Cfr precedentemente identificate e studi funzionali dimostravano chiaramente che il gene era in grado di conferire il fenotipo PhLOPS_A. Analisi genomiche hanno infine evidenziato che il gene *cfr*(E) era parte di un elemento genetico, non caratterizzato, con similarità nucleotidiche a sequenze genomiche di vari *Firmicutes* intestinali (Stojkovic *et al.*, 2019).

1.2.4 Il gene *optrA*

Un altro meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni è determinato dal gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*), scoperto nel 2015 in un isolato clinico di *E. faecalis* resistente al linezolid e privo sia di *cfr/cfr*-like che di mutazioni ribosomiali (Wang *et al.*, 2015). Il gene è in grado di conferire resistenza sia ai fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo) che agli oxazolidinoni (incluso il tedizolid) ed è localizzato in un plasmide di 36 kb, denominato pE349, in associazione con il gene *fexA* responsabile della resistenza ai fenicoli (figura 16).

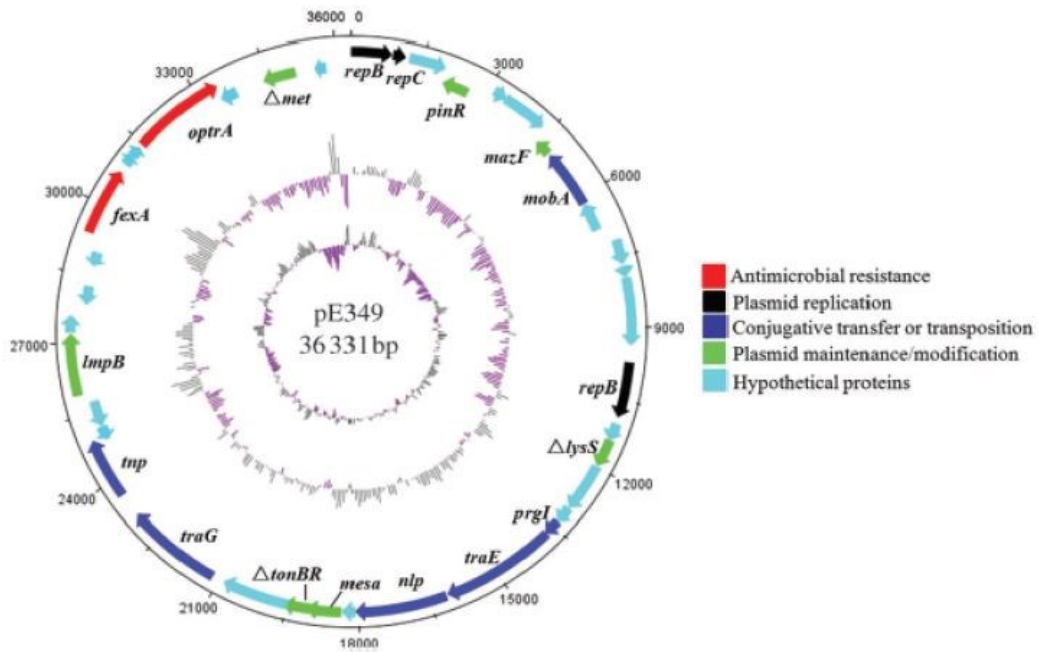


Figura 16. Rappresentazione schematica del plasmide pE349 di *E. faecalis* E349.

La proteina OptrA (OptrA_{E349}) mostrava un'identità aminoacidica >99% con le proteine appartenenti alla famiglia ABC-transporter. Lo studio ha rivelato che OptrA era filogeneticamente correlato alle proteine Vga(A), Vga(C), Vga(E) e Lsa(E) in grado di conferire resistenza a lincosamidi, pleuromutiline e streptogramine di gruppo A. Analisi strutturali hanno evidenziato la presenza di domini di legame per l'ATP, caratteristici di questa famiglia di proteine, e l'assenza del dominio transmembrana (Wang *et al.*, 2015). Recenti studi, hanno dimostrato che il gene *optrA*, è in grado di conferire antibiotico-resistenza attraverso un meccanismo di protezione del ribosoma batterico (Sharkey *et al.*, 2016). Le proteine di protezione ABC-F si legano alla subunità 50S del ribosoma batterico, provocandone la modificazione conformazionale e determinando il rilascio dell'antibiotico, consentendo quindi alla cellula di riprendere la traduzione (Ero *et al.*, 2019) (Figura 17).

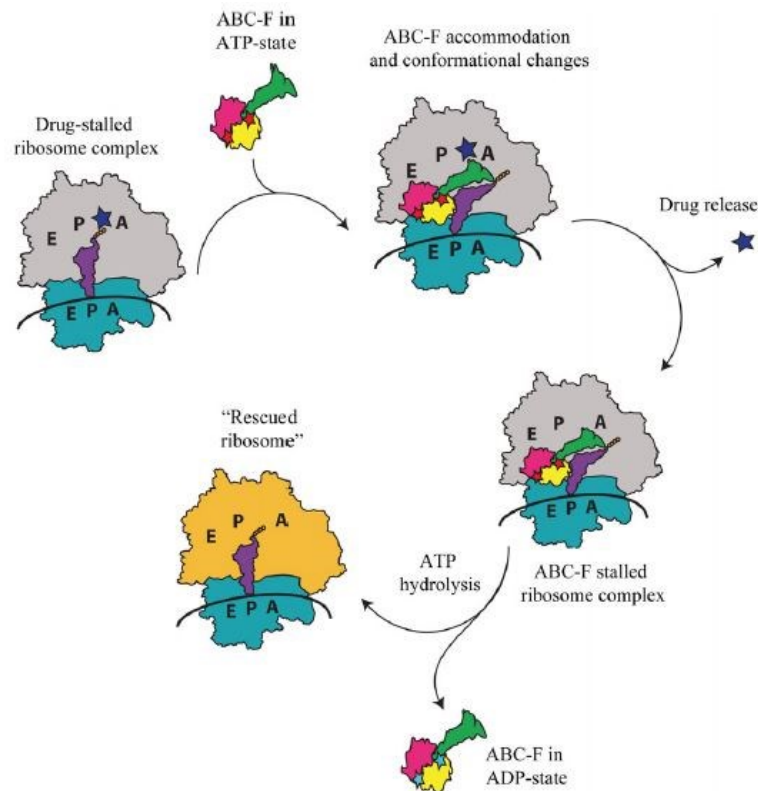


Figura 17. Rappresentazione schematica del meccanismo di protezione ribosomiale delle proteine ABC-F. La stella blu identifica il sito PTC, target dell'antibiotico. Le stelle in rosso e in azzurro indicano il legame con ATP e ADP

Vari studi hanno evidenziato un gran numero di contesti genetici di *optrA*, localizzati sia su plasmidi che su cromosoma batterico (all'interno di specifici trasposoni) (He *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2019, Zhou *et al.*, 2020). In queste piattaforme genetiche *optrA* è spesso associato al gene *fexA* e ad altri determinanti, suggerendo che il gene di resistenza può persistere e diffondersi grazie alla presenza di antibiotici diversi da quelli responsabili del fenotipo PhLOPS_A, come precedentemente osservato per il gene *cfp* (Torres *et al.*, 2018). In particolare, i contesti genetici *optrA* sono spesso fiancheggiati da IS1216 che sembrano codificare trasposasi responsabili della diffusione del gene di resistenza (He *et al.*, 2016) (Figura 18).

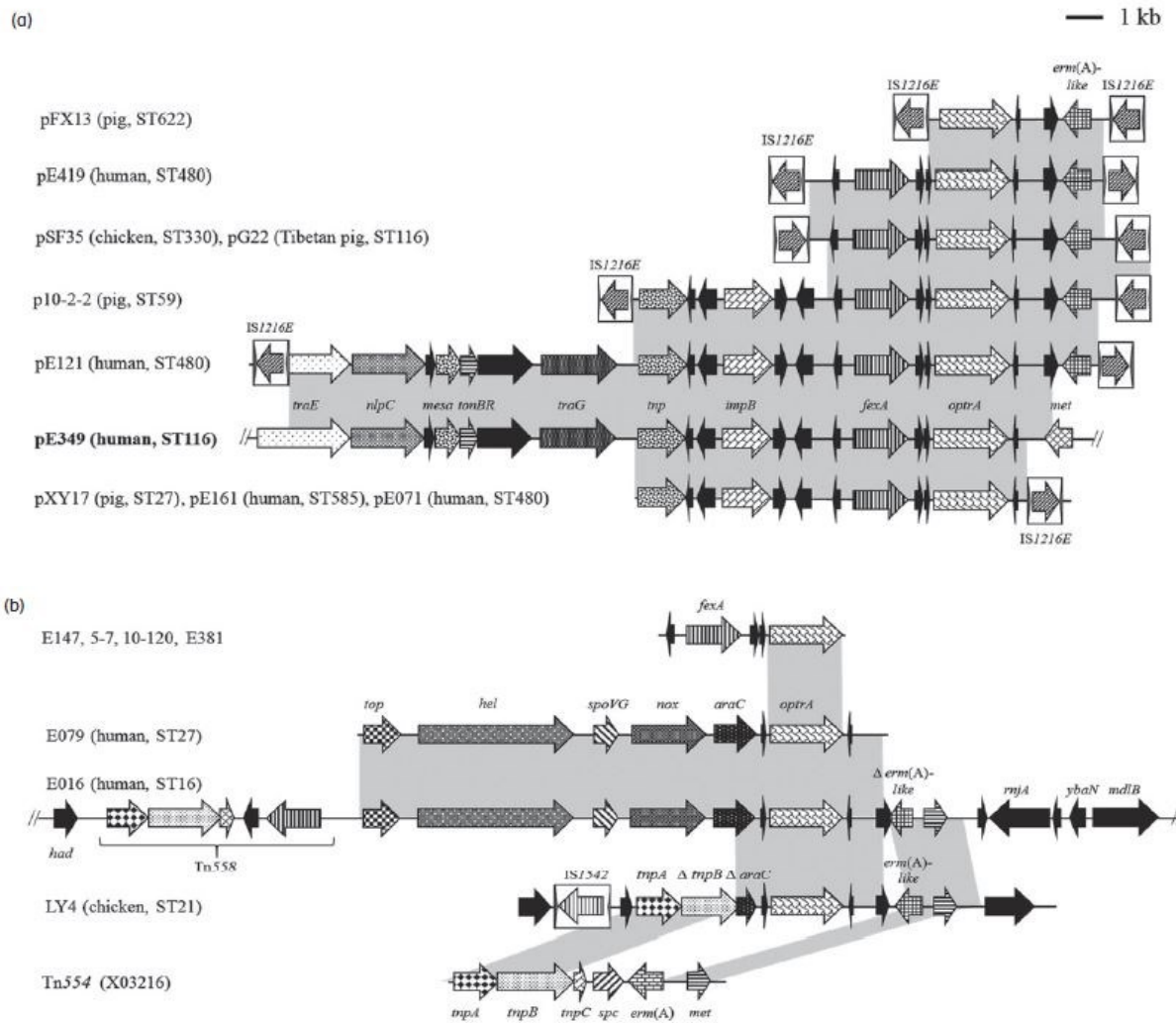


Figura 18. (a-b) Rappresentazione schematica dei contesti di *optrA* plasmidici e cromosomici riportati nello studio di He *et al.* Le aree con omologia >98% sono indicate in grigio.

Numerosi studi hanno evidenziato come il gene *optrA* risulti essere prevalentemente diffuso in enterococchi di origine animale che sembra rappresentino un importante serbatoio per la diffusione del gene di resistenza (Cavaco *et al.*, 2017; Tamang *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2018).

optrA risulta essere diffuso anche in altri isolati Gram-positivi di origine animale: *S. aureus* (Guo *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2020), *Staphylococcus sciuri* e *S. simulans* (Fan *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019), *Streptococcus suis* e *S. gallolyticus* (Huang *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019, Shang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020), in ceppi anaerobi di *Clostridium perfringens* (Zhou *et al.*, 2020) e persino nei batteri Gram-negativi come in isolati di *C. coli* di origine animale (Liu *et al.*, 2020).

La prima comparsa del gene in Italia è stata evidenziata nel 2016 in due ceppi di *E. faecium* con ridotta sensibilità al linezolid (MIC 4 mg/L) isolati da emocoltura, nei campioni era presente anche una copia di un *cfr* silente (Brenciani *et al.*, 2016).

Una peculiarità del gene *optrA* è la sua ampia variabilità nucleotidica che si riflette nella sequenza amminoacidica. Infatti, poco dopo aver identificato il determinante di resistenza due studi hanno evidenziato la presenza di varianti della proteina OptrA in enterococchi di origine clinica e animale in Cina (Cai *et al.*, 2015, Cui *et al.*, 2016) (Tabella 3); tutte le varianti alleliche hanno mostrato sostituzioni amminoacidiche il cui impatto sul fenotipo di resistenza non è ad oggi del tutto chiarito. Un successivo studio ha inoltre evidenziato che la variante OptrA italiana (OptrA_{E35048}) differiva dalla proteina *wild type* (OptrA_{E349}) molto più (20 sostituzioni amminoacidiche) di quanto non avvenga con le varianti cinesi che mostrano un limitato numero di sostituzioni (Morrone *et al.*, 2017) (Tabella 3).

Tabella 3. Varianti amminoacidiche di OptrA in isolati di *Enterococcus spp.*

Sequenza		Localizzazione	Isolato				Linezolid MIC mg/L	Referenza
Variante	Sostituzione amminoacidica		Specie	Anno di isolamento	Fonte	Sequence Type		
Wild type		p	<i>E. faecalis</i>	2009	h	116	8	Wang <i>et al.</i> , 2015
		c	<i>E. faecalis</i>	2011	h	476	4	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	476	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	2012	a	27	8	He <i>et al.</i> , 2016
		c	<i>E. faecalis</i>	2012	a	619	8	He <i>et al.</i> , 2016
		c	<i>E. faecalis</i>	2012	a	403	8	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	655	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	655	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	619	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	81	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	585	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	656	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	658	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	2014	h	585	16	He <i>et al.</i> , 2016
		c	<i>E. faecalis</i>	2014	h	256	8	He <i>et al.</i> , 2016
		p	<i>E. faecalis</i>	nr	h	480	19	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	8 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
RDK	Ile104Arg, Tyr176Asp, Glu256Lys	nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	207	8	Cai <i>et al.</i> , 2015

		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	314	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	4 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
DP	Tyr176Asp, Thr481Pro	nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	632	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	476	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	49	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	2012	a	59	4	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	16	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	480	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	480	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	2013	a	622	4	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	659	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	nr	h	480	4	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	7 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
EDM	Lys3Glu, Tyr176Asp, Ile622Met	nr	<i>E. faecalis</i>	2012	h	59	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	657	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	657	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		c	<i>E. faecalis</i>	2013	h	16	4	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	591	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecium</i>	2014	h	97	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. thailandicus</i>	2014	h	nr	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	6 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016

EDD	Lys3Glu, Tyr176Asp, Gly393Asp	c	<i>E. faecalis</i>	2012	a	93	2	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	192	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. gallinarum</i>	2014	h	nr	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	6 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
KD	Thr112Lys, Tyr176Asp	p	<i>E. faecalis</i>	2012	a	116	8	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	16	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2013	h	16	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	2013	a	330	8	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	16	8	Cai <i>et al.</i> , 2015
		p	<i>E. faecalis</i>	nr	h	480	2	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	3 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
EYDNDM	Lys3Glu, Asn12Tyr, Tyr176Asp, Asp247Asn, Gly393Asp, Ile622Met	nr	<i>E. faecalis</i>	2010	h	593	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	368	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	593	2	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	1 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
EDP	Lys3Glu, Tyr176Asp, Thr481Pro	nr	<i>E. faecalis</i>	2014	h	480	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
DD	Tyr176Asp, Gly393Asp	c	<i>E. faecalis</i>	2009	a	21	2	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecium</i>	2011	h	885	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		c	<i>E. faecalis</i>	2013	h	27	8	He <i>et al.</i> , 2016
		nr	<i>E. faecium</i>	2010	h	882	4	Cai <i>et al.</i> , 2015
		nr	2 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016

DK	Tyr176Asp, Glu256Lys	nr	1 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
ED	Lys3Glu, Tyr176Asp	nr	3 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
KDP	Thr112Lys, Tyr176Asp, Thr481Pro	nr	4 <i>Enterococcus spp.</i>	nr	h	nr	nr	Cui <i>et al.</i> , 2016
LEYYWDVDASKELYNKQLEIG OptrA _{E35048}	Met1Leu, Lys3Glu, Asn12Tyr, Asn122Tyr, Tyr135Trp, Tyr176Asp, Ala350Val, Gly393Asp, Val395Ala, Ala396Ser, Gln509Lys, Gln541Glu, Met542Leu, Asn560Tyr, Lys562Asn, Gln565Lys, Glu614Gln, Ile627Leu, Asp633Glu, Asn640Ile, Arg650Gly	nr	<i>E. faecium</i>	2015	h	117	4	Brenciani <i>et al.</i> , 2016

^a Variante: le sostituzioni amminoacidiche sono descritte utilizzando il codice a singola lettera. Sostituzione: sostituzione amminoacidica e relativa posizione.

^b Localizzazione: p plasmidica, c cromosomica

^c Specie enterococcica non specificata

^d Fonte di isolamento: h umana, a animale

Successive indagini hanno evidenziato come i geni di resistenza agli oxazolidinoni, spesso, risultino essere associati in diversi elementi genetici mobili e che quindi possano contribuire sinergicamente al fenotipo di resistenza.

Una co-localizzazione plasmidica di *optrA* e *cfrr*, è stata riportata sia per isolati di origine animale (Li *et al.*, 2016, Fan *et al.*, 2017) che per due ceppi di *E. faecium* di origine umana (Lazaris *et al.*, 2017, Morroni *et al.*, 2018). In un ceppo clinico di *E. faecalis* è stata evidenziata la presenza concomitante di un Tn6218 cromosomico contenente *cfrr(B)* e di un plasmide portante il gene *optrA* (Kuroda *et al.*, 2018). Recentemente è stata anche identificata una co-localizzazione plasmidica per i geni *cfrr(D)* e *optrA* in un ceppo clinico di *E. faecium* irlandese (Egan *et al.*, 2020).

1.2.5 Il gene *poxA*

Il più recente meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni è il gene *poxA* (*phenicols, oxazolidinones and tetracyclines*), identificato per la prima volta in un MRSA (ceppo AOUC-0916) linezolid-resistente isolato da un paziente con fibrosi cistica (Antonelli *et al.*, 2018) e codificante una proteina appartenente alla famiglia delle ABC-F. Analisi BLASTP hanno evidenziato un'identità aminoacidica del 32% con la proteina OptrA. Lo studio funzionale in diversi background genetici (*E. coli*, *S. aureus* ed *E. faecalis*) ha mostrato che *poxA* era in grado di ridurre la sensibilità ai fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo), agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid) e alle tetracicline (tetraciclina e doxyciclina) attraverso un meccanismo di protezione ribosomiale (Antonelli *et al.*, 2018). L'analisi del genoma di *S. aureus* AOUC-0915 ha mostrato che il gene *poxA* era associato a un trasposone composito, denominato Tn6349 di 48 kb, a sua volta inserito nel profago ϕ N315-*like* identificato nel cromosoma di MRSA AOUC-0915. Il trasposone Tn6349, fiancheggiato da due sequenze di inserzione IS1216, conteneva altri due nuovi trasposoni di più piccole dimensioni: (i) il Tn6657, portante i geni di resistenza *poxA* e *fexB*; (ii) Tn6644 che includeva il gene *cfr* ed in grado di formare dei *minicircles*. (D'Andrea *et al.*, 2019) (Figura 19).

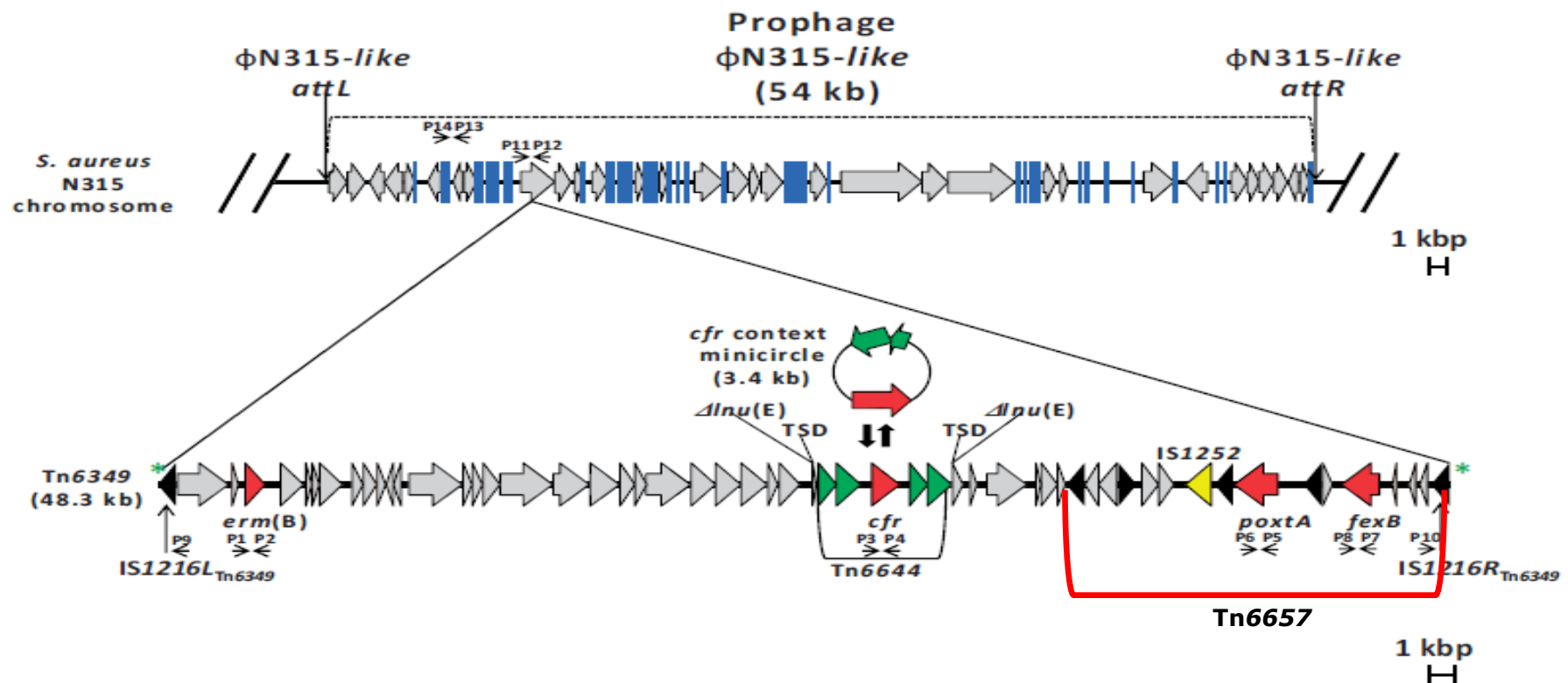


Figura 19. Rappresentazione dell'ambiente genetico (sezione superiore) e struttura (sezione inferiore) del trasposone Tn6349, inserito nel cromosoma di *S. aureus* AOUC-0915. Le due copie di IS1216 che delimitano Tn6349 sono indicate rispettivamente come IS1216L_{Tn6349} e IS1216R_{Tn6349}. Gli asterischi verdi indicano la posizione delle ripetizioni dirette di 8 bp (5'-AAACAAAT-3') che fiancheggiano il trasposone. Le copie di IS1216 sono mostrate come frecce nere (l'orientamento corrisponde a quello del loro gene *tnpA*), mentre le altre IS sono indicate rispettivamente da frecce gialle (IS1252) e verdi (IS_{Enfa5}). I geni di resistenza *erm(B)*, *cfr*, *poxtA* e *fexB* sono indicati in rosso. Il trasposone Tn6657 è evidenziato da un semi-rettangolo rosso.

Esperimenti di sequenziamento e mappatura hanno definito il contesto genetico di *oxxA*: il gene è fiancheggiato da due IS *1216* (denominate IS *1216_U* ed IS *1216_D*), con lo stesso orientamento. L'IRL di IS *1216_D*, all'estremità 3' del gene, è parte della regione codificante, mentre, l'IRR è interrotta dall'inserimento di una IS *1252*-like. Una porzione della IRR di IS *1216_D* è stata evidenziata a valle della IS *1252*, suggerendo che l'inserimento di questa IS si sia verificato successivamente alla mobilizzazione di *poxA* (Figura 20).

Lo stesso studio ha evidenziato che il nuovo gene *poxA* era presente in alcuni ceppi Gram-positivi (*Enterococcus spp.* e *Pediococcus acidilactic*), per lo più di origine animale, suggerendo che la selezione di *poxA* potrebbe essere avvenuta nel serbatoio animale a causa dell'ampio uso di fenicoli nella medicina veterinaria (Antonelli *et al.*, 2018). A conferma di tale ipotesi Brenciani *et al.*, nel 2019 hanno identificato il primo ceppo di *E. faecium* linezolid-resistente, di origine suina, contenente il gene *poxA* su due plasmidi coniugativi, rispettivamente di ~30 kb e ~97 kb, ed in grado di conferire resistenza al linezolid anche in assenza di altri meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni ad oggi conosciuti (Brenciani *et al.*, 2019).

Dalla sua scoperta nel 2018 ad oggi, il gene *poxA* è stato indentificato in isolati enterococcici di origine sia animale che umana provenienti da differenti aree geografiche (Hao *et al.*, 2019, Papagiannitsis *et al.*, 2019, Egan *et al.*, 2020, Freitas *et al.*, 2020) e perfino in ceppi di *E. faecium* di campioni d'aria di allevamenti di suini spagnoli (Ruiz-Ripa *et al.*, 2019).

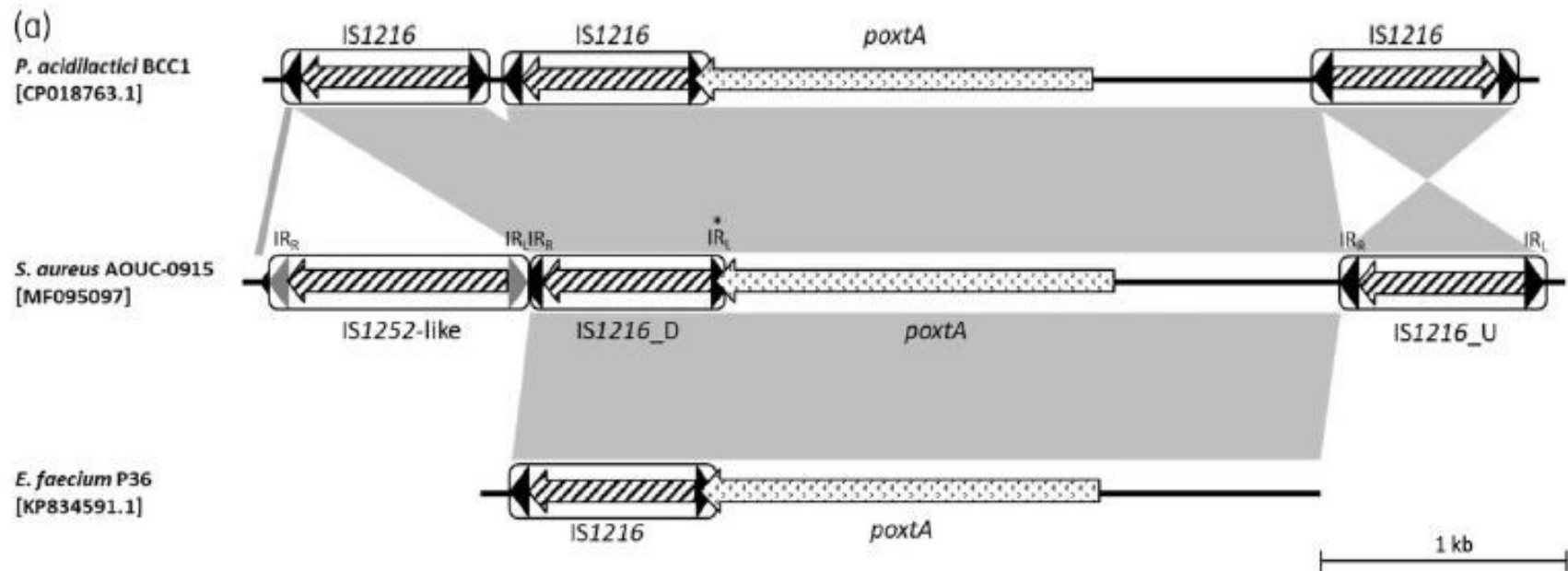


Figura 20. Confronto dei contesti genetici di *poxtA* in *P. acidilactici* BCC1, in *E. faecium* P36 e in *S. aureus* AOUC-0915. Le regioni con identità nucleotidica > 99% sono connesse da aree grigie.

A differenza delle proteine OptrA e Cfr(C), la sequenza amminoacidica di PoxxA è essenzialmente conservata, anche se recentemente sono state identificate tre varianti: (i) due, contenenti una sostituzione amminoacidica rispetto alla proteina *wild-type*, caratterizzate in ceppi di *E. faecium* [R256H (Lei *et al.*, 2019) e I219L (Ruiz-Ripa *et al.*, 2020)]; (ii) una terza variante allelica è stata descritta in un ceppo di *E. faecalis* isolato dalla cavità nasale di un maiale in Corea. In questa variante, otto nuovi amminoacidi (TPEEEQKY) rimpiazzano sei amminoacidi (GSVAKF) presenti nell'estremità carbossi-terminale della proteina PoxxA (Jung *et al.*, 2021), tuttavia il ruolo funzionale di queste alterazioni deve ancora essere definito.

Come per gli altri geni di oxazolidinone-resistenza anche i contesti genetici di *poxxA* mostrano una localizzazione prevalentemente plasmidica (Elghaieb *et al.*, 2019, Kang *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019, Egan *et al.*, 2020). In tutti i contesti genetici ad oggi studiati, *poxxA* è sempre fiancheggiato da elementi IS 1276 che sembrano siano responsabili della mobilità del determinante di resistenza. A conferma di questa ipotesi è stato suggerito che processi di trasposizione e traslocazione, mediati da IS 1276, siano responsabili della disseminazione e della persistenza del gene *poxxA*, nella popolazione enterococcica (Shan *et al.*, 2020). In alcuni casi, *poxxA* è co-localizzato con *fexB* nel trasposone Tn6657; in altri casi, anche se *fexB* si trova nello stesso plasmide, non è rilevato nello stesso contesto genetico di *poxxA*. Questa variabilità genetica indica che l'acquisizione di *poxxA* potrebbe avvenire attraverso una serie di eventi di ricombinazione nei plasmidi enterococcici (Freitas *et al.*, 2020).

La co-localizzazione di *poxxA* e *cfr* nel trasposone composito Tn6349 è stata riportata solo in MRSA AOUC-0915 (D'Andrea *et al.*, 2019). Li e colleghi, hanno identificato un isolato di *E. hirae* positivo per i geni *poxxA* e *cfr*, ma localizzati su plasmidi diversi (Li Dexi *et al.*, 2020). Un recente studio ha identificato un nuovo contesto genetico, in un ceppo di *E. faecalis* isolato in un allevamento coreano, contenente il cluster di antibiotico-resistenza *fexA-poxxA-cfr(D)*, tuttavia la localizzazione (plasmidica o cromosomica) di questa regione rimane ad oggi sconosciuta (Jung *et al.*, 2021).

È stata anche individuata una co-localizzazione plasmidica dei geni *poxA* e *optrA* in un *E. faecalis* suino proveniente dalla Cina (Hao *et al.*, 2019). Sono susseguite altre segnalazioni di *poxA* e *optrA* all'interno di elementi coniugativi in isolati clinici e animali provenienti da diverse aree geografiche come Spagna, Irlanda e Cina (Hao *et al.*, 2019; Egan *et al.*, 2020; Moure *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020).

1.3 Epidemiologia della resistenza al linezolid

Ad oggi sono istituiti due programmi di sorveglianza, volti allo studio e al monitoraggio della resistenza al linezolid nei batteri Gram-positivi: (i) LEADER (*Experience and Accurate Determination of Resistance*) negli Stati Uniti; (ii) ZAAPS (*Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum*) come programma di sorveglianza mondiale. Secondo queste organizzazioni il linezolid mostra un'efficacia pressoché totale nei confronti degli enterococchi. Infatti, il tasso di resistenza a questo antibiotico negli enterococchi (LRE) è dello 0,22% per lo ZAAPS (Mendes *et al.*, 2018) e dello 0,78% per il LEADER (Flam *et al.*, 2016), con una minore incidenza della linezolid-resistenza in *E. faecalis* (LREfs) rispetto ad *E. faecium* (LREfm). Nessun'altra specie LRE è stata rilevata da ZAAPS e LEADER. La maggior parte degli LREfs erano isolati in Europa e in Asia, mentre gli LREfm erano distribuiti principalmente in Europa e Nord America. Nel dettaglio il 46,4% dei ceppi LREfs è stato documentato in Europa, il 31,4% in Asia, il 16,1% in Nord America, il 2,7% in Sud America e il 3,4% in Oceania. Mentre il 64,2% degli isolati LREfm è stato segnalato in Europa, il 27,3% in Nord America, il 7,7% in Asia, il 6% e meno dell'1% in Sud America e in Oceania (Figura 21) (Bi *et al.*, 2018).

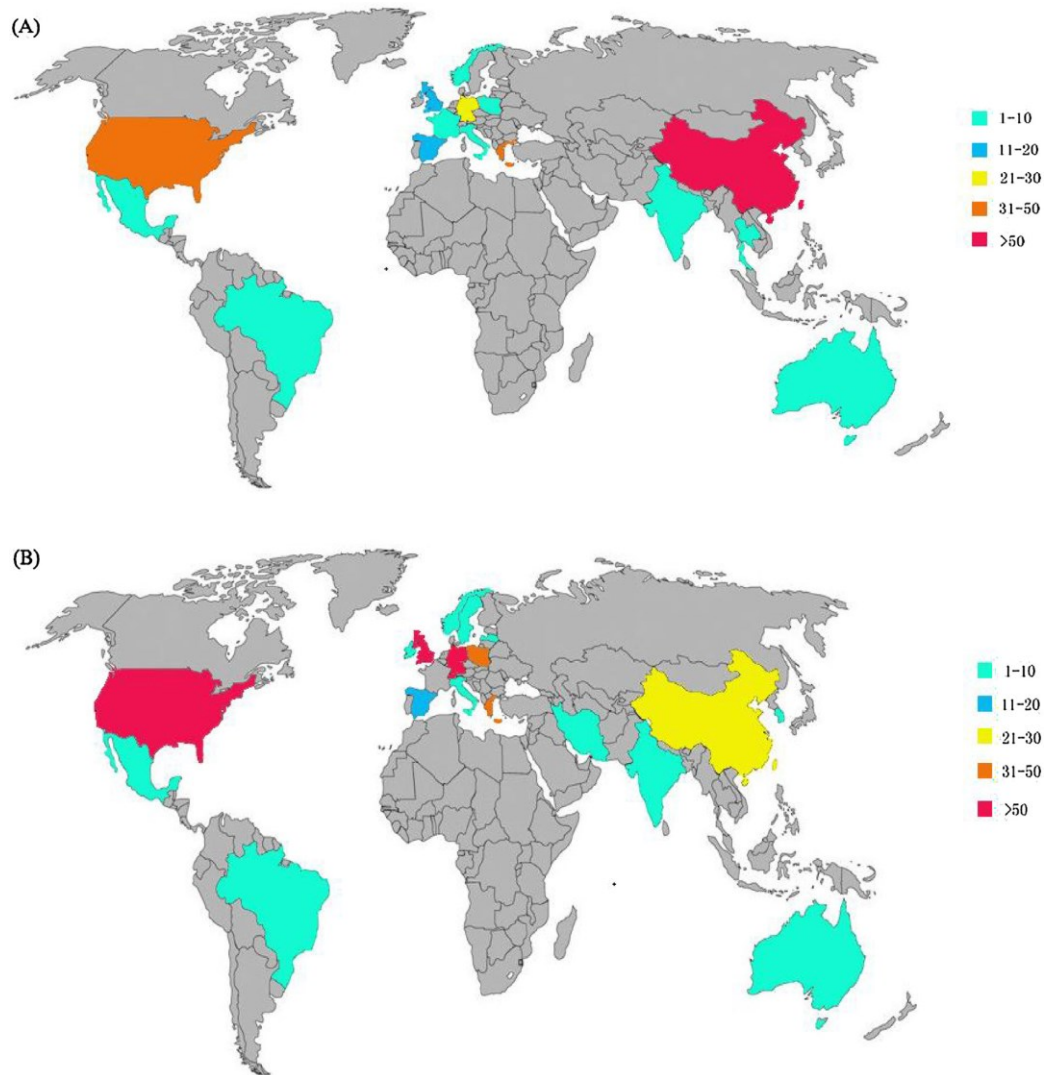


Figura 21. Distribuzione della resistenza al linezolid nella popolazione enterococcica in diverse aree del globo. (A) Diffusione ceppi *E. faecalis*-linezolid resistente (LREfs) e (B) Diffusione ceppi *E. faecium* linezolid-resistente (LREfm). I diversi colori rappresentano il diverso numero di isolati LRE. (A) Isolati LREf segnalati in Nord America (USA, Messico), Europa (Grecia, Germania, Spagna, Regno Unito, Francia, Italia, Norvegia, Polonia), Asia (Cina, Thailandia, India), Sud America (Brasile) e Oceania (Australia). (B) Isolati LREfm segnalati in Nord America (USA, Canada, Messico), Europa (Regno Unito, Grecia, Germania, Spagna, Italia, Norvegia, Polonia, Svezia, Lettonia), Asia (Cina, Corea del Sud, India, Iran), Sud America (Brasile) e Oceania (Australia). Per le aree in grigio non sono disponibili dati.

Sebbene gli oxazolidinoni mostrino una potente attività nei confronti della popolazione enterococcica (>99%), la disseminazione dei geni *cfrr/cfr*-like, *optrA* e *poxtA* potrebbe compromettere l'utilità clinica di questa famiglia di antibiotici.

Recentemente è stato condotto uno studio per valutare l'incidenza dei meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni in un'ampia collezione di isolati clinici di enterococchi, proveniente da varie aree del globo, isolati fra il 2008 e il 2016 (Deshpande *et al.*, 2018). I risultati di questo lavoro confermano una bassa prevalenza di isolati enterococcici non sensibili al linezolid (0,38%) e i meccanismi di resistenza agli oxazolidinoni sembrano essersi distinti tra *E. faecalis* ed *E. faecium*. Infatti, *optrA* è più diffuso, rispetto alla presenza di alterazioni dell'rRNA 23S, in *E. faecalis* ed è l'unico meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni identificato tra gli isolati dal 2014 al 2016; mentre le mutazioni in corrispondenza dell'23S rRNA (G2576U) rappresentano il principale meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni in *E. faecium* (Deshpande *et al.*, 2018). È interessante notare come i geni *cfrr* o *cfrr(B)* siano sempre associati a un altro meccanismo di resistenza al linezolid: *optrA* in *E. faecalis* e G2576U in *E. faecium*, pertanto non è chiaro se il gene *cfrr* conferisca di fatto la resistenza al linezolid nella popolazione enterococcica (Deshpande *et al.*, 2018). Ad oggi non esiste una sorveglianza sulla resistenza agli oxazolidinoni che consideri anche l'incidenza della resistenza mediata dal gene *poxtA*.

I pochi dati sull'incidenza dell'attività del tedizolid indicano che tutti i ceppi saggiati sono uniformemente sensibili a questo oxazolidinone di seconda generazione (Pfaller *et al.*, 2016, Pfaller *et al.*, 2019).

In Italia non esiste un vero e proprio programma di sorveglianza nazionale per la resistenza agli oxazolidinoni, sono stati condotti solo pochi studi locali, riguardanti stafilococchi ed enterococchi, che danno una parziale visione della distribuzione della resistenza nel nostro paese. Riguardo gli enterococchi alcuni lavori documentano la comparsa di ceppi linezolid-resistenti per la presenza della mutazione G2576U (Bonora *et al.*, 2006 A; Bonora *et al.*, 2006 B; Lambiase *et al.*, 2007; Cian *et al.*, 2009; Fossati *et al.*, 2010; Raponi *et al.*, 2010). Solo recentemente alcuni studi hanno evidenziato, anche nel nostro paese, la comparsa dei primi ceppi enterococcici contenenti geni di resistenza

acquisiti: (i) *cfr* e *optrA* trovati in due *E. faecium* di origine clinica con ridotta sensibilità al linezolid (Brenciani *et al.*, 2016); (ii) *optrA* e *poxtA* identificati in enterococchi isolati da campioni di sedimenti e zooplancton in due zone costiere italiane (Fioriti *et al.*, 2021). Diversi studi di sorveglianza per la resistenza al linezolid negli enterococchi di origine animale (specialmente da suini, dove la resistenza è più comune) sono stati condotti in Cina (Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2018). Al contrario, solo pochissimi studi di questo tipo sono stati condotti in Europa (Munk *et al.*, 2018), nessuno di questi in Italia.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento e isolamento di enterococchi

In collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico di Perugia, è stato progettato e realizzato il campionamento di tamponi fecali di origine suina, in modo da essere rappresentativo della produzione suinicola della regione Marche, escludendo al contempo piccole realtà agricole. In base a questo criterio sono stati presi in considerazione allevamenti da ingrasso con almeno 200 maiali e aziende da riproduzione aventi almeno 20 scrofe. Il campionamento è stato stratificato sulla tipologia di allevamento suddividendo la regione Marche in due settori: Marche Nord (Aree Vaste 1 e 2) e Marche Sud (Aree Vaste 3, 4 e 5) (Figura 22).

Sono stati selezionati 76 allevamenti di cui 39 allevavano suini da ingrasso, 28 ospitavano suinetti in svezzamento e 9 presentavano entrambe le categorie. Le informazioni relative all'uso di antibiotici sono state ottenute dai registri delle aziende agricole ed erano disponibili per 60 aziende su 76. Nell'anno precedente la raccolta dei campioni gli antibiotici più frequentemente somministrati negli allevamenti marchigiani erano il florfenicolo, le tetracicline, le pleuromutiline e la lincomicina.

Tra Aprile 2018 e Luglio 2019 ha avuto avvio la fase esecutiva del progetto, per ogni allevamento tre pool fecali sono stati raccolti in diversi siti conformemente alle linee guida di campionamento previste dal piano di monitoraggio nazionale tedesco nella produzione primaria della filiera bovina, suina e di polli da ingrasso (Hering *et al.*, 2017).

Complessivamente sono stati raccolti 255 campioni: 144 provenienti da maiali da ingrasso e 111 derivanti da suini in svezzamento. I campioni sono stati conservati a 4°C prima della semina, per un massimo di 8 ore. Cinque grammi di ciascun campione omogeneizzato sono stati inoculati in 45 mL di acqua peptonata con aggiunta di florfenicolo ad una concentrazione di 10 mg/L e incubato a 44°C per 48 ore. Successivamente 100 µL sono stati prelevati e seminati su piastre di *Slanetz-Bartley* agar (Liofilchem, Roseto degli abruzzesi, Italia) contenenti florfenicolo 10 mg/L. Nelle piastre che

mostravano crescita batterica è stata arbitrariamente selezionata una colonia di enterococchi. Gli isolati selezionati sono stati conservati a -20°C.



Figura 22. Regione Marche, Aree Vaste e città

2.2 Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale dai campioni batterici è stata ottenuta mediante l'impiego di *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* fornito dalla ditta *ThermoScientific* (ThermoScientific, Vilnius, Lituania).

Il campione proveniente da coltura pura era inizialmente risospeso in 1 mL d'acqua sterile e successivamente centrifugato per 6 minuti a 6000 X g. Il pellet veniva poi risospeso con 180 µL di *Lysis buffer* (contenente acqua, Tris HCl 1M, EDTA 0,5 M e Triton x-100) e 3,6 mg di lisozima e incubato a 37° C per 30 minuti. A ciascun campione venivano aggiunti 200 µL di *Lysis solution* e 20 µL di Proteinasi K con un'ulteriore incubazione di 30 minuti a 56 °C. Lo step successivo prevedeva l'aggiunta di 20 µL di RNasi e una incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni venivano miscelati con 400 µL di etanolo al 50% mediante vortex. Il contenuto della *ependorf* era quindi trasferito in una colonnina già attivata fornita dal kit, centrifugando il tutto per un minuto a 8000 X g.

Seguivano due lavaggi con 500 µl di *Wash buffer*. Il DNA purificato era ottenuto utilizzando 200 µl di *Elution buffer* e centrifugando per un minuto a 6000 X g. Tutti i campioni venivano conservati a -20° C fino al momento dell'uso.

2.3 Caratterizzazione genotipica e identificazione degli isolati batterici

Gli isolati florfenicolo-resistenti sono stati analizzati mediante PCR per la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni: *optrA*, *cfr* e *poxA* utilizzando le coppie di primer riportate in Tabella 3 (Brenciani *et al.*, 2019). I ceppi *S. aureus* AOUC-0915 (*cfr* e *poxA*) (Antonelli *et al.*, 2016) ed *E. faecium* E35048 (*cfr* e *optrA*) (Brenciani *et al.*, 2016) sono stati utilizzati come controlli positivi negli esperimenti di PCR. Gli ampliconi sono stati ottenuti utilizzando la *Dream Taq polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). I prodotti di PCR erano sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1% in *TAE* (Tris Acetato EDTA) applicando una corrente di 80 Volt. Gli amplificati erano visualizzati mediante transilluminatore utilizzando una lunghezza d'onda di 260 nm. I marker utilizzati erano: *GeneRule 100bp DNA Ladder* e *GeneRule 1kb DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific). Tutti gli isolati positivi ad almeno uno dei tre determinanti di resistenza sono stati identificati attraverso MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La specie è stata successivamente confermata mediante *Whole Genome Sequencing* (WGS).

Tabella 3. Coppie di primers utilizzate in questo studio

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')	Dimensione amplicon (bp)
<i>cfr</i>	cfr-FW	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	746
	cfr-RV	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	
<i>optrA</i>	optrA-FW	TACTTGATGAACCTACTAACCA	422
	optrA-RV	CCTTGA ACTACTGATTCTCGG	
<i>poxA</i>	poxA-FW	GAACGCTTGGAGTATTTGACTTC	778
	poxA-RV	CTGGACTGAGAATACCCATC	

2.4 Antibiotici

Gli antibiotici acquistati sottoforma di polveri (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) sono stati risospesi mediante opportuni solventi (linezolid e tetraciclina in acqua; florfenicolo e cloramfenicolo in etanolo) ad una concentrazione finale di 10 mg/L. Le sospensioni madri sono state conservate a -20° C. *MIC Test Strip* per il tedizolid è stato ottenuto dalla ditta Liofilchem (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) e conservato a 4°C.

2.5 Test di sensibilità

La sensibilità degli enterococchi agli antibiotici: florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tetraciclina è stata determinata mediante il metodo della microdiluizione in brodo in accordo con la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2017). La tecnica prevede di standardizzare l'inoculo batterico ad una concentrazione di 5×10^5 CFU/ml in *Mueller-Hinton II* (Oxoid, Basinstoke, UK). I campioni venivano poi inoculati in *multiwell*, precedentemente preparate con concentrazioni scalari degli antibiotici di interesse. Le piastre erano incubate successivamente a 37°C per 24 ore. In concomitanza, sono stati eseguiti gli E-test (test epilsometrico) per il tedizolid. Il *MIC test Strip* prevedeva inoculi standardizzati a concentrazioni di 1×10^8 CFU/ml, la semina dei campioni avveniva mediante l'utilizzo di tamponi sterili su piastre di *Mueller-Hinton agar* Oxoid, Basinstoke, UK). Si procedeva dunque, al posizionamento della *strip* di tedizolid al centro della piastra e alla successiva incubazione a 37°C per 24 ore.

I valori di MIC sono stati interpretati sulla base dei *breakpoint* suggeriti da CLSI (documento CLSI M100-S27) (CLSI, 2017) ed EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility), *E. faecalis* ATCC 29212 è stato utilizzato come ceppo di controllo (Tabella 4).

Tabella 4. Breakpoint suggeriti dal CLSI relativi agli antibiotici saggiati in questo studio.

	Breakpoint <i>Enterococcus</i> spp. (mg/L)		
	Sensibile	Intermedio	Resistente
Florfenicolo	N.D.*	N.D.	N.D.
Cloramfenicolo	≤ 8	16	≥ 32
Linezolid	≤ 2	4	≥ 8
Tedizolid	≤0.5	-	-
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16

*N.D. non disponibile. Per il florfenicolo non sono disponibili breakpoint in quanto l'antibiotico non è usato in ambito clinico.

2.6 Smal-Pulsed Field Gel Electrophoresis e S1-PFGE

La Smal-PFGE è stata eseguita applicando il protocollo descritto da Ripa et al. (Ripa *et al.*, 2001). I ceppi venivano fatti crescere *overnight* in BHI (*Brain Heart Infusion Oxoid, Basingstore, UK*) a 37°C. Le brodocolture venivano diluite fino a raggiungere una concentrazione di DNA pari a circa 10 µg/mL. A questo punto 1 mL della sospensione batterica veniva prima centrifugato e poi lavato con 0,5 mL di *TEN* (Tris EDTA NaCl) *Buffer*. Il pellet così ottenuto veniva risospeso in 0,5 mL di *TEN Buffer*, mescolato con un volume identico di *low-melting-point agarose* (Bio-Rad, Hercules, USA) all'1,6% e inserito in appositi stampi (*plug-mold*) per la creazione delle *plugs*. Trascorso il tempo necessario per la solidificazione dei blocchetti di agarosio, 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) (Sigma). Seguiva una ulteriore incubazione per 24 ore a 50°C in presenza di 3 mL di *Digestion Buffer* contenente 0,5 µg/mL proteinasi K. Le *plugs*, a questo punto, venivano lavate 3 volte in 5 mL di *TE* (Tris EDTA) *Buffer*. Metà plug veniva incubata *overnight* utilizzando 30 U dell'enzima di restrizione *Smal* (ThermoFisher Scientific) per consentire la digestione del DNA. 1 mL di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) 0,5 M veniva

utilizzato per bloccare la digestione. Ciascuna plug veniva poi adagiata su un pettine e inclusa all'interno di un gel di *Pulsed Field Certified Agarose* (Bio-Rad, Milano, Italia) all'1%. Le corse elettroforetiche, eseguite in presenza del tampone *TBE* (Tris Borato EDTA) *Buffer*, sono state effettuate tramite l'ausilio dell'apparecchiatura *Chef Mapper XA System* (Biorad). Le condizioni applicate sono state: tempo 22 ore, campo 6 V/cm, *switch* iniziale 1 secondo, *switch* finale 30 secondi, *ramping factor* lineare. Terminata la corsa, il gel era colorato grazie ad una soluzione di acqua e bromuro d'etidio (0,5 µg/mL) e visualizzato mediante MoonLight (Diatech-labline, Jesi, Italia) utilizzando una lunghezza d'onda di 260 nm. I marker utilizzati erano: *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, Ipswich, USA) e *Lambda Marker* (Promega, Madison, USA).

Per determinare il numero e le dimensioni dei plasmidi degli isolati è stata effettuata una S1-PFGE. La procedura per l'attuazione del protocollo di S1-PFGE ha step comuni con *SmaI*-PFGE, le divergenze riguardano: (i) la digestione, effettuata con 10 U di S1-nuclease (ThermoFisher Scientific) enzima in grado di linearizzare i plasmidi; (ii) le condizioni di corsa applicate, campo 6 V/cm, *switch* iniziale 1 secondo, *switch* finale 20 s, *ramping factor* lineare per 16 ore. La dimensione dei plasmidi era stabilita mediante il software Analysis-Labimage 1D (Diatech-labline, Jesi, Italia).

2.7 Saggi di trasferibilità mediante coniugazione

Per valutare la trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni sono stati utilizzati come donatori, in esperimenti di coniugazione su filtro, tutti gli enterococchi risultati positivi ad almeno un gene di resistenza. I riceventi usati erano: *E. faecium* 64/3 ed *E. faecalis* JH2-2, due isolati batterici sensibili a linezolid (rispettivamente MIC \leq 2 mg/L e 0,5 mg/L) e florfenicolo (MIC \leq 4 mg/L per entrambi). Donatore e ricevente, venivano fatti crescere in BHI brodo fino al raggiungimento di una OD₆₇₅ di 0,4 e poi filtrati utilizzando filtri di nitrocellulosa da 0,22 µm (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Prelevato il filtro sterilmente dall'apparato di filtrazione, esso veniva posizionato al centro di una piastra preriscaldata di BHI agar e incubato overnight a 37°C.

Il filtro, successivamente, veniva lavato con 10 mL di soluzione fisiologica per recuperare i batteri adesi sullo stesso. La sospensione batterica veniva centrifugata a 8.000 X g per 10 minuti ed il pellet risospeso in 1 mL di soluzione fisiologica sterile. Si procedeva quindi con la realizzazione di diluizioni scalari fino alla diluizione 10^{-15} . Piastre selettive di BH agar utilizzate per la conta delle CFU/mL di donatori e riceventi, erano inoculate con 10 μ L di tutte le diluizioni effettuate. La selezione dei transconiuganti era eseguita mediante lo spatolamento di 100 μ L di sospensione batterica (dell'intero e di tutte le diluizioni) su piastre di BH agar contenenti florfenicolo (8 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Trascorse 24/48 ore di incubazione a 37°C in aerofilia si valutava la crescita batterica e si procedeva alla conta delle colonie. La frequenza di trasferimento era espressa come numero di transconiuganti per CFU di ricevente. Il *background genetico* dei transconiuganti era confermato mediante *Sma*I-PFGE.

I transconiuganti ottenuti negli esperimenti di coniugazione erano testati per la presenza di geni di resistenza al linezolid mediante PCR e per la loro sensibilità a florfenicolo, cloramfenicolo, linezolid e tedizolid.

2.8 Intermedi circolari

Per valutare la capacità di escissione dei contesti genetici dei determinanti di resistenza al linezolid, sono stati allestiti esperimenti di PCR mapping utilizzando specifiche coppie di primers interne ai geni *cfi*, *optrA*, *poxA* e *cfi*(D) (Tabella 5). L'amplificazione è stata ottenuta utilizzando la *ExTaq polymerase* (TaKaRa Bio, Shiga, Japan). I prodotti di PCR sono stati risolti mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1% in *TAE* (Tris Acetato EDTA) e applicando una corrente di 80 Volt. Gli amplificati erano visualizzati impiegando il transilluminatore ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Il marker utilizzato era il GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Tabella 5. Coppie di primer usate per lo studio delle forme circolari.

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')
<i>cfr</i>	cfrdiv-FW	ACCTGAGATGTATGGAGAAG
	cfrdiv-RV	GAATGAGAGAGTAGAAACGG
<i>cfr(D)</i>	cfr(D)-FW	TTCCTAAAATAAAACGACTA
	cfr(D)-RV	TACAAAAAGATTCCCAGCCA
<i>optrA</i>	optrAdiv-FW	GAAAAATAACACAGTAAAAGGC
	optrAdiv-RV	TTTTTCCACATCCATTTCTACC
<i>poxA</i>	poxAdiv-FW	GACGAGCCGACCAACC
	poxAdiv-RV	TTCAGGCGGACAAAATCCAA

2.9 Southern blotting e ibridazione

Allo scopo di identificare la localizzazione dei geni di resistenza, i frammenti derivanti dalla restrizione con S1-nucleasi e risolti per mezzo della PFGE, sono stati trasferiti per capillarità su una membrana di nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad). Il gel, sottoposto precedentemente a depurinazione e denaturazione, era messo a contatto con una membrana di nylon carica positivamente per una notte. Successivamente, la membrana di nylon veniva irradiata con raggi U.V. (260 nm per 20 secondi) allo scopo di fissare il DNA ad essa. La membrana era quindi pre-ibridata per 2 ore a 67°C nel tampone *Ultra-hyb* (*Ultrasensitive Hybridization Buffer*) (Applied Biosystems, Foster City, USA). In seguito, venivano aggiunte le sonde marcate con biotina, preventivamente denaturate a 100°C per 10 minuti. Infine, si procedeva ad una incubazione *overnight* alla temperatura specifica.

Le sonde utilizzate, erano ottenute partendo da amplificati di PCR utilizzando come *target* il DNA dei ceppi in esame. Gli ampliconi purificati utilizzando il kit *GenElute PCR Cleanup* (Sigma-Aldrich), sono stati marcati impiegando il kit *Psoralen-Biotin BrightStar* (Ambion, ThermoFisher Scientific).

Terminata l'ibridazione la membrana veniva sottoposta ad una serie di lavaggi utilizzando soluzioni a forza ionica decrescente contenenti *SSC Buffer* (saline-sodio citrato) e *SDS*

(sodio dodecil-solfato) per rimuovere l'eccesso di sonda. I differenti lavaggi della membrana sono schematizzati in figura 2. La rilevazione del segnale, fase successiva ai lavaggi, avveniva conformemente a quanto indicato nel kit di marcatura. In breve, il legame tra biotina e streptavidina genera un segnale luminoso in grado di impressionare la lastra fotografica dopo 30-40 secondi di esposizione (Brenciani *et al.*, 2016).

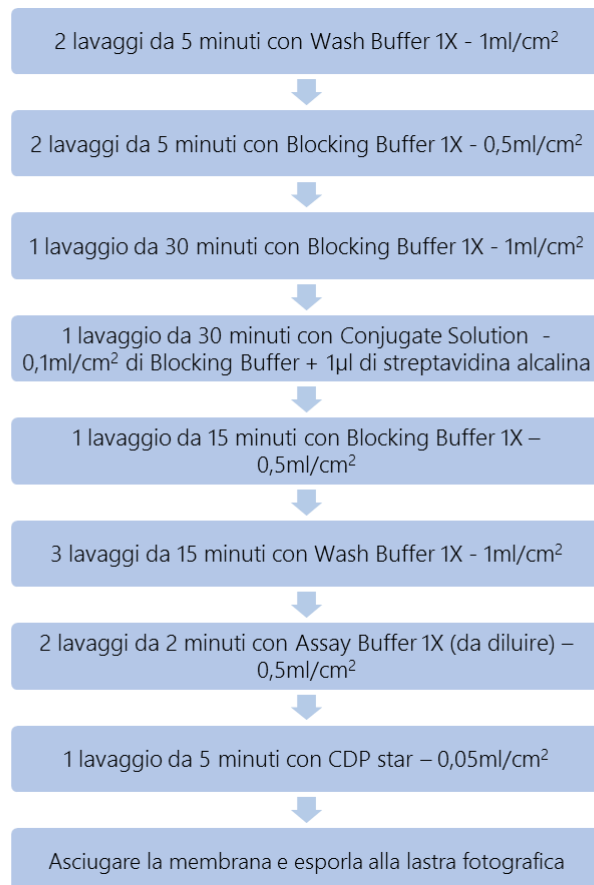


Figura 23. Successione dei lavaggi della membrana per la rilevazione della sonda specifica marcata con biotina.

2.10 Sequenziamento e analisi di sequenza

Il sequenziamento degli amplificati è stato ottenuto mediante il metodo *Sanger* utilizzando l'apparecchiatura *ABI Prism* (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California) con terminatori marcati. L'analisi di sequenza è stata eseguita usando un programma fornito dalla *Perkin-Elmer Applied Biosystems*. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante i programmi *Chromas Lite* (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) e *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Il sequenziamento genomico è stato eseguito, in collaborazione con l'unità di Microbiologia e Virologia dell'ospedale Careggi di Firenze, mediante WGS usando la tecnologia *Illumina Miseq* con reads 2x150 bp. L'assemblaggio delle reads è stato eseguito mediante i software *abyss* (<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss>) e *SPAdes* (<http://bioinf.spbau.ru/spades>) (Bankevich A *et al.*, 2012). L'identificazione *in silico* dei geni di resistenza antimicrobica acquisiti, delle mutazioni ribosomiali coinvolte nella resistenza agli oxazolidinoni e le analisi clonale sono state effettuate utilizzando strumenti disponibili presso il *Center for Genomic Epidemiology* <http://www.genomicepidemiology.org/> (MLST v.2.0, ResFinder v.3.2, LRE-finder v.1.0) e mediante i software *BLAST*, *ORF Finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e *RAST* (<http://rast.nmpdr.org>).

I complessi clonali sono stati definiti mediante eBURST (<http://www.phyloviz.net/goeburst/>).

Le correlazioni filogenetiche dei ceppi batterici caratterizzati nello studio, sono state studiate utilizzando i genomi appartenenti alle stesse specie disponibili nel database NCBI-NIH. La valutazione degli alberi filogenetici basati sugli SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) è stata eseguita mediante Snippy versione 4.4.3, lasciando i parametri di default (Seeman *et al.*, 2018). Gli alberi filogenetici sono stati realizzati attraverso il software filogenomico iq-tree v1.6.12 utilizzando gli allineamenti degli SNPs principali. Per gli SNPs situati in siti non costanti è stato utilizzato il modello K3P per la correzione di eventuali errori (Nguyen *et al.*, 2015). I rami sono stati valutati mediante *bootstrap standard* non parametrico utilizzando 100 alberi replicati. L'albero finale è stato visualizzato e modificato con l'ausilio di Microreact v48.0.0 (<https://microreact.org/showcase>).

2.11 Numeri di accesso

Le sequenze nucleotidiche dei contesti genetici di *cfp*, *cfp(D)* e *optrA* sono state depositate nel database *GenBank* con i seguenti numeri di accesso: da MT723949 a MT723965, MW013838 e MW013839.

3. RISULTATI

3.1 Ricerca di enterococchi florfenicolo-resistenti, analisi genotipica e fenotipica

Dai 76 allevamenti suinicoli campionati sono stati raccolti 255 pool fecali, di questi 145 risultavano essere positivi per la presenza di enterococchi florfenicolo-resistenti (56.9%, Intervallo di Confidenza 95%: 50.6%-63): il 57.7% (64/111) dei campioni derivavano da suini svezzati mentre il 64.9% (79/144) provenivano da maiali da ingrasso.

La ricerca dei determinanti di antibiotico resistenza agli oxazolidinoni (*cfi*, *optrA* e *poxtA*), effettuata mediante saggi di PCR, mostrava che 30 isolati su 145 risultavano essere positivi per la presenza di almeno un gene di resistenza al linezolid. Gli isolati, provenienti dai 23 allevamenti, includevano: 15 *E. faecalis*, 7 *E. faecium*, 4 *Enterococcus avium*, 2 *Enterococcus hirae*, 1 *Enterococcus gallinarum* e 1 *Enterococcus thailandicus* (Tabella 6).

I risultati di PCR hanno evidenziato che *optrA* era il gene di resistenza al linezolid più diffuso, essendo rilevato in 23/30 isolati ed è risultato strettamente associato alla specie *E. faecalis* (15/15 ceppi testati). L'analisi delle sequenze amminoacidiche della proteina OptrA ha rivelato che quattro isolati possedevano una proteina *wild-type* (OptrA_{E349}), identica a quella di *E. faecalis* E349 (Wang *et al.*, 2015), mentre diciannove mostravano otto varianti della proteina OptrA, cinque delle quali erano del tutto originali (Tabella 7). Il gene *poxtA* era rilevato in 7/30 isolati mentre 6/30 campioni risultavano essere positivi a *cfi*.

Il gene *cfi*, che non è stato rilevato in *E. faecium*, era solitamente associato al gene *optrA* in 5/6 isolati testati. Inoltre, tra i 15 enterococchi appartenenti a specie diverse da *E. faecalis*, i geni *optrA* e *poxtA* sono stati identificati rispettivamente in 8/15 isolati (distribuiti fra le specie *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* ed *E. hirae*) e in 7/15 (distribuiti fra le specie *E. faecium* ed *E. hirae*) (Tabella 6).

L'analisi dei dati WGS ha evidenziato anche la presenza del gene *cfi*(D) in 3 isolati: *E. faecalis* S221 e S337, ed *E. avium* S193 (Tabella 6). Il gene era identico alla sequenza di riferimento presente nel plasmide 4 di *E. faecium* E8014 (numero di accesso: LR135354.1)

(Guerin *et al.*, 2020). L'analisi genomica ha escluso la presenza sia dei geni *cfr*(B), *cfr*(C) e *cfr*(E) che delle mutazioni ribosomiali (rRNA 23S e proteine ribosomiali L3/L4).

I trenta enterococchi testati mostravano *pattern* di sensibilità o resistenza sia al linezolid (MIC *range*, 0,5–8 mg/L) che al tedizolid (MIC *range*, 0,25–4 mg/L) e alti livelli di resistenza al florfenicolo (MIC *range*, 16–> 128 mg/L), cloramfenicolo (MIC *range*, 16–> 128 mg / L) e alle tetracicline (MIC *range*, 32–> 128 mg /L) (Tabella 6).

Tabella 6. Geni di resistenza al linezolid, profili di suscettibilità antimicrobica e dati di tipizzazione dei 30 enterococchi.

Ceppo	Specie	Geni di resistenza agli oxazolidinoni				MIC (mg/L)					MLST	Fattoria	Area Vasta	Azienda
		<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>cfrD</i>	<i>poxTA</i>	FFC ^a	CHL	LZD	TZD	TE				
S183	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	32	64	2	1	64	ST27	AP13 ^b -W ^c	4	D
S184	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	64	128	2	2	64	ST27	AP13-W	4	D
S217	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	32	64	2	2	128	ST330	AP27-W	4	0
S219	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	32	128	4	1.5	128	ST314	AN1-F ^d	2	E
S221	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	32	64	2	2	64	ST314	AN1-W	2	E
S224	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	64	128	4	2	128	ST476	AN2-W	2	E
S232	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	128	128	2	3	128	ST476	AN5-F	2	0
S251	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	64	16	4	2	64	ST16	PS2-F	1	0
S338	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	64	64	1	2	128	ST476	MC9-F	3	C
S339	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	128	>128	4	4	128	ST476	MC9-F	3	C
S340	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	128	>128	4	2	128	ST314	MC12-W	3	C
S341	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	>128	>128	8	4	128	ST585	MC12-W	3	C
S377	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	32	32	4	2	128	ST73	MC17-W	3	0
S380	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	64	128	4	2	>128	ST108	MC20-W	3	0
S381	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	128	128	2	2	>128	ST108	MC20-W	3	D
S156	<i>E. faecium</i>	-	-	-	+	>128	32	8	4	128	ST1667	MC1-W	3	0

S157	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+	>128	32	8	3	32	ST1534	AP1-F	5	A
S194	<i>E. faecium</i>	-	-	-	+	64	16	4	1.5	128	ST142	AP18-F	4	A
S195	<i>E. faecium</i>	-	-	-	+	64	16	2	1	128	ST184	AP19-F	5	D
S297	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	>128	64	4	1.5	128	ST957	AP30-F	5	0
S345	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	128	>128	4	2	128	ST21	MC8-F	3	A
S356	<i>E. faecium</i>	-	-	-	+	>128	64	4	1.5	128	ST1734	MC13-W	3	C
S212	<i>E. hirae</i>	-	-	-	+	128	64	8	1.5	128	-	AP24-F	5	A
S214	<i>E. hirae</i>	-	-	-	+	128	32	8	1.5	128	-	AP25-F	4	A
S173	<i>E. avium</i>	-	+	-	-	32	32	1	0.25	32	-	AP12-F	4	C
S176	<i>E. avium</i>	+	+	-	-	32	16	2	1.5	32	-	AP7-F	4	0
S193	<i>E. avium</i>	+	-	+	-	16	16	1	0.5	32	-	AP18-F	4	D
S252	<i>E. avium</i>	+	+	-	-	32	16	4	0.75	32	-	PS2-F	1	0
S325	<i>E. gallinarum</i>	+	+	-	-	64	64	0.5	0.75	>128	-	MC2-W	3	E
S155	<i>E. thailandicus</i>	+	+	-	-	>128	>128	4	2	64	-	AP3-W	4	A

^a FFC, florfenicolo; CHL, chloramphenicol; LZD, linezolid; TZD, tedizolid; TE, tetraciclina;

^b Codice fattoria;

^c W, scezzamento;

^d F, ingrasso.

Tabella 7. Varianti della proteina OptrA identificate nei 23 isolati di *Enterococcus* spp.

Sequenza OptrA ^a	Ceppo	ST ^b	Referenza
Variante	Sostituzione amminoacidica		
Wild type (OptrA _{E349})	-	<i>E. faecalis</i> S224 <i>E. faecalis</i> S338 <i>E. faecalis</i> S339 <i>E. faecalis</i> S232	ST476 ST476 ST476 ST476 Wang et al.
DP	Y176D T481P	<i>E. faecalis</i> S341	ST585 Morrioni et al.
KD	T112K Y176D	<i>E. faecalis</i> S380 <i>E. faecalis</i> S381	ST108 ST108 Morrioni et al.
DD	Y176D G393D	<i>E. faecium</i> S297	ST957 Morrioni et al.
DDM	Y176D G393D I622M	<i>E. faecium</i> S157 <i>E. gallinarum</i> S325	ST1534 - Questo studio
EYD	K3E D12Y Y176D	<i>E. faecalis</i> S251 <i>E. avium</i> S252	ST16 - Questo studio
EYKWDVDASKELYNKQLEIG	K3E N12Y N122K Y135W Y176D A350V G393D V395A A396S Q509K Q541E M551L N560Y K562N Q565K E614Q I627L D633E N640I R650G	<i>E. thailandicus</i> S155 <i>E. avium</i> S176 <i>E. faecium</i> S345	- - ST21 Cai et al.
EYKWKVDASKELYNKQLEIG	K3E N12Y N122K Y135W I287K A350V G393D V395A A396S Q509K Q541E M551L N560Y K562N Q565K E614Q I627L D633E N640I R650G	<i>E. faecalis</i> S183 <i>E. faecalis</i> S184 <i>E. faecalis</i> S217 <i>E. faecalis</i> S219 <i>E. faecalis</i> S221 <i>E. faecalis</i> S340	ST27 ST27 ST330 ST314 ST314 ST314 Questo studio
EYCKDVDASKELYNKQLEIG	K3E N12Y N122K Y135C E161K Y176D A350V G393D V395A A396S Q509K, Q541E, M551L, N560Y, K562N, Q565K, E614Q, I627L, D633E, N640I, R650G	<i>E. avium</i> S193	- Questo studio
YKCKDSVDASKELYNKQLEIG	K3E N12Y N122K Y135W Y176D A350V G393D V395A A396S Q509K Q541E M551L N560Y K562N Q565K E614Q I627L D633E N640I R650G	<i>E. faecalis</i> S377	ST73 Questo studio

^a Variante: le sostituzioni amminoacidiche sono descritte utilizzando il codice a singola lettera. Sostituzione: sostituzione amminoacidica e relativa posizione. ^b ST, sequence type

3.2 Caratterizzazione filogenetica degli isolati enterococcici

Una prima tipizzazione degli isolati recanti almeno un gene di resistenza al linezolid è stata effettuata mediante *Sma*I-PFGE, i pulsotipi risultanti sono stati suddivisi per specie e confrontati tra loro tenendo in considerazione il numero e le dimensioni delle bande.

Nei 15 isolati di *E. faecalis* solo 2 ceppi risultavano essere strettamente correlati: S380 e S381, mentre per gli altri campioni non era evidente alcuna correlazione (Figura 24, tabella 6).

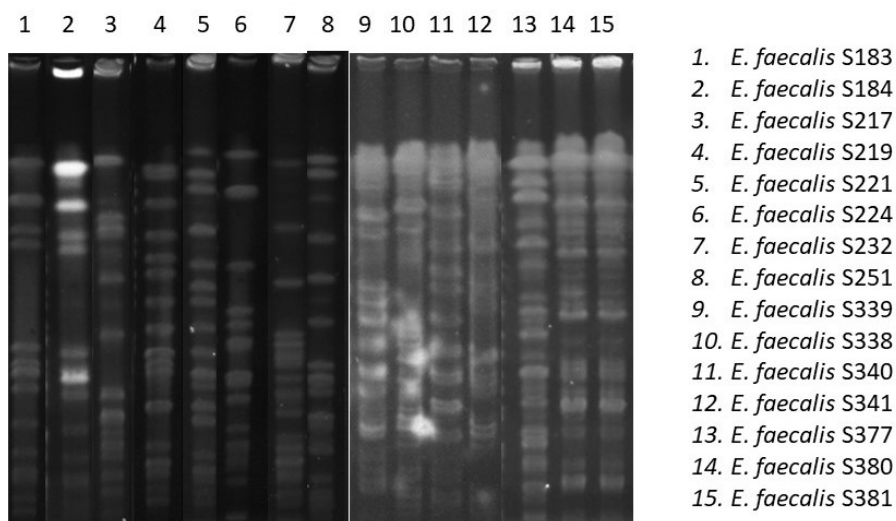


Figura 24. *Sma*I-PFGE dei 15 ceppi di *E. faecalis*

Anche gli isolati appartenenti alla specie *E. faecium* e alle specie enterococciche minori risultavano non essere epidemiologicamente correlati, (Figura 25; Tabella 6).

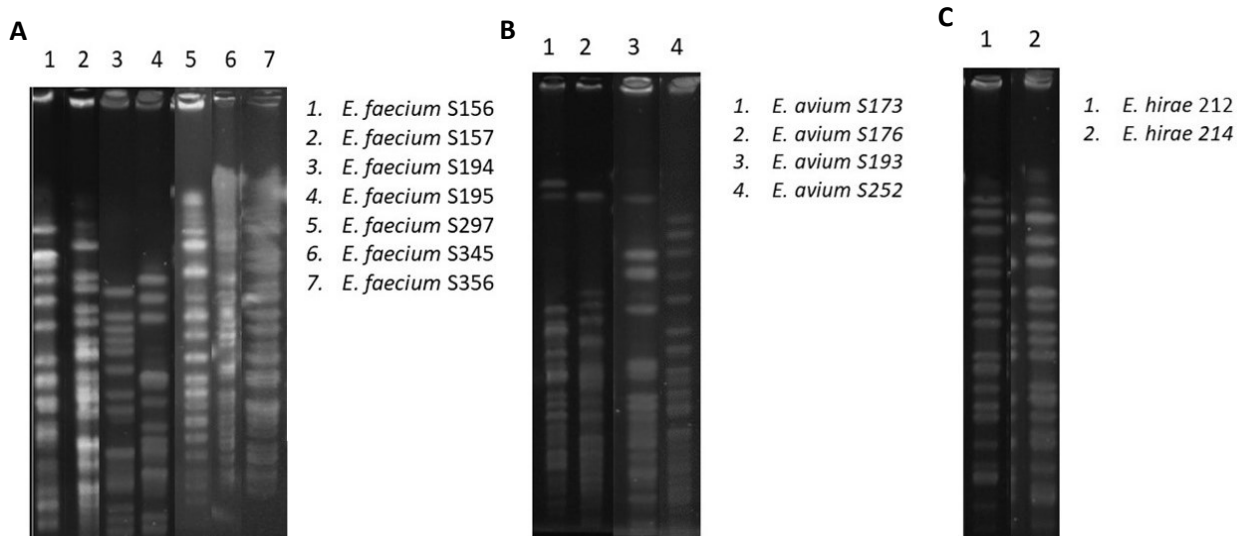


Figura 25. *Sma*I-PFGE di: A) *E. faecium*; B) *E. avium*; C) *E. hirae*

Successivamente l'analisi MLST (*multilocus sequence type*) dei 15 *E. faecalis* ha evidenziato la presenza di otto *Sequence Type* (ST) noti (ST16, ST27, ST73, ST108, ST314, ST330, ST476 e ST585); di cui quattro ST16, ST27, ST476 e ST585 erano associati a enterococchi umani (Torres *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2019; Guerin *et al.*, 2020; Camarà *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Una più approfondita analisi mediante WGS ha inoltre mostrato che gli isolati di *E. faecalis* appartenenti allo stesso ST erano strettamente correlati tra loro (isolati appartenenti a ST27, ST108, ST73, ST314 e ST476, *range* SNPs 2-62) (Tabella 8, Figura 26-28). In due casi, i ceppi correlati sono stati raccolti dalla stessa azienda (isolati appartenenti a ST27, ST108). In altri casi, come ad esempio i ceppi appartenenti a ST314, ST73 e ST476, sono stati isolati da diversi allevamenti che, solo per il clone ST73, erano della stessa azienda. Per quanto riguarda la correlazione tra ceppi con enterococchi già sequenziati, gli isolati di *E. faecalis* erano nel complesso altamente correlati (*range* SNPs 36-107) a ceppi di origine animale (ad esempio ceppi associati a ST108, ST314 e ST476) presenti in paesi diversi (USA, Brasile e Tunisia), mentre il ceppo ST16 era più strettamente correlato a ceppi provenienti da fonti diverse (di origine ambientale e umana) (Figura 26-28).

Gli isolati di *E. faecium* mostravano sette linee clonali distinte sulla base dei dati MLST: ST21, ST142, ST184, ST957, ST1534 e ST1667, tutti di origine animale, e un nuovo *sequence type* ST1734 (Torres *et al.*, 2018; He *et al.*, 2016). L'analisi eBURST ha rivelato che ST21 apparteneva al complesso clonale CC17. Sono stati inoltre identificati altri due complessi clonali: il primo comprendeva ST957 e ST1667 mentre il secondo conteneva ST184 e ST1534, entrambi con una variazione di due locus genici. Studiando le SNPs del genoma di *E. faecium* appartenente a ST21 si è osservato che il ceppo era più simile ad un isolato di origine umana proveniente dagli Stati Uniti (SNPs n = 182) (Figura 29, G).

Nelle specie enterococciche minori si sono evidenziate alcune correlazioni filogenetiche significative: (i) due *E. hirae* S212 e S214, isolati da due diversi allevamenti ma provenienti dalla stessa azienda, erano quasi identici (SNPs n = 1) ed entrambi hanno mostrato un alto grado di somiglianza con un isolato canadese di origine animale (SNPs n = 7-8); (ii) quattro *E. avium*, raccolti da allevamenti diversi, non erano correlati tra loro (SNPs n =

17901–25698) mentre il ceppo S252 era correlato con due isolati dalla Germania e uno dalla Mongolia (SNP n= 226-232); (iii) il ceppo di *E. thailandicus*, isolato dall'allevamento AP3-PV, non presentava correlazioni con ceppi della stessa specie (SNPs n = 7574–9638); (iv) il ceppo di *E. gallinarum* mostrava un alto grado di somiglianza con isolati provenienti da diverse aree geografiche, principalmente di origine animale (SNPs n = 17–79) (Figura 30-31, H-M).

Tabella 8. Dati utilizzati per la costruzione degli alberi filogenetici.

ST (n. degli isolati)	Specie	Numero genomi utilizzati	Range delle distanze minime degli SNP	Range delle distanze massime degli SNP	Media	Mediana	Origine animale	Origine umana	Altri/ non conosciuti	Range degli SNP dei ceppi isolati
ST16 (1)	<i>E. faecalis</i>	99	46	4753	194	107	18	75	6	-
ST27 (2)	<i>E. faecalis</i>	3	520-523	3250-3255	1837-1832	1710-1717	2	1	-	15
ST108 (2)	<i>E. faecalis</i>	109	88-90	379-381	325-327	329-331	97	12	-	22
ST314 (3)	<i>E. faecalis</i>	12	67-83	582-598	533-549	791-807	11	-	1	2-34
ST330 (1)	<i>E. faecalis</i>	2	382	810	571	571	1	-	-	-
ST476 (4)	<i>E. faecalis</i>	3	36-55	331-354	189-204	205-228	3	-	-	3-62
ST585 (1)	<i>E. faecalis</i>	5	198	212	206,4	207	5	-	-	-
ST21 (1)	<i>E. faecium</i>	9	182	3786	2436	3089	4	3	2	-
(1)	<i>E. gallinarum</i>	43	17	3762	497	29	17	21	5	-
(2)	<i>E. hirae</i>	154	7-8	4663-4664	157-158	125-126	55	89	10	1
(4)	<i>E. avium</i>	23	229-16411	24613-26329	20463-24854	19542-25247	1	22	-	17901-25698
(1)	<i>E. thailandicus</i>	5	7574	9638	8237	7867	2	-	3	-

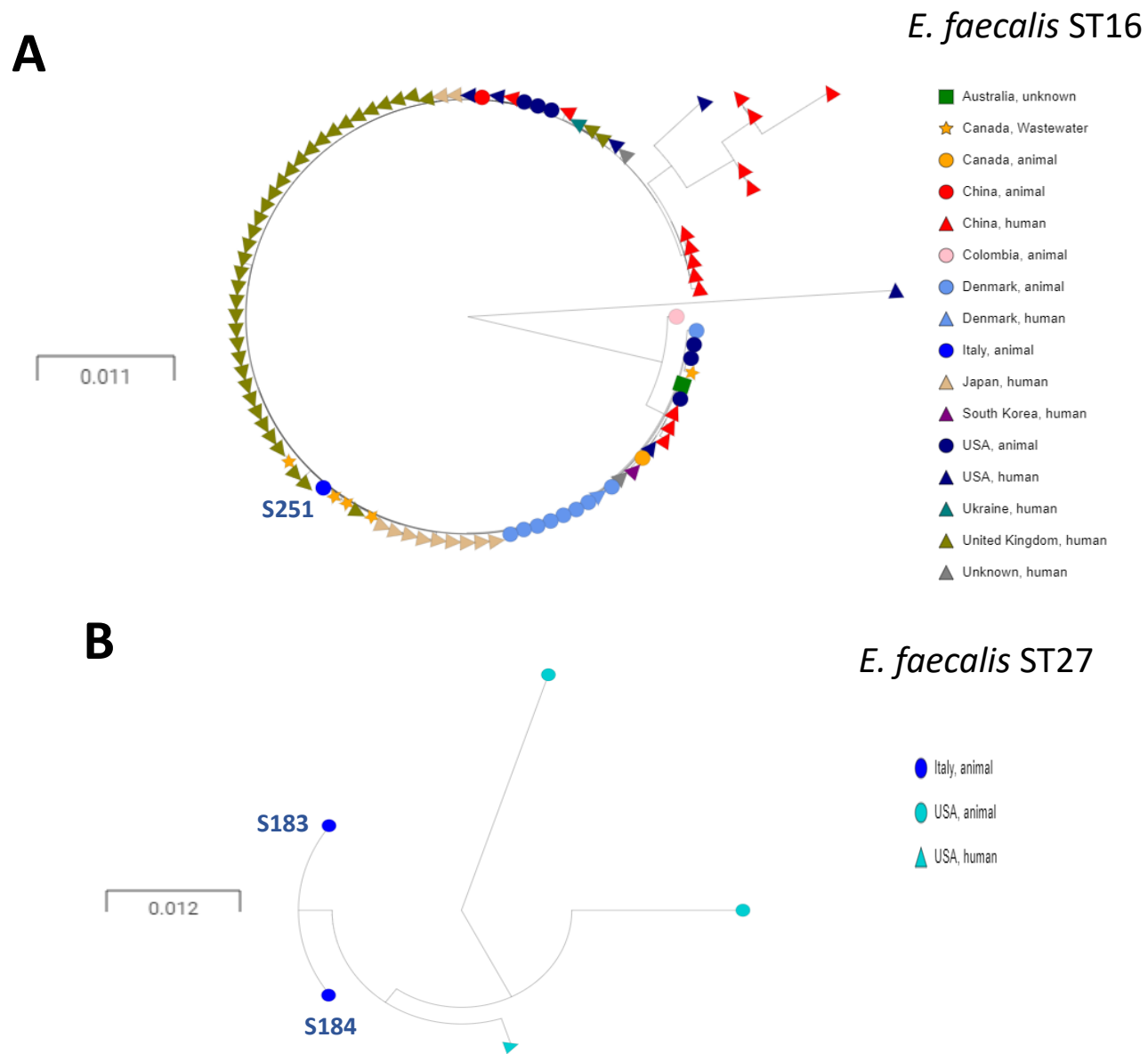


Figura 26. Alberi filogenetici degli isolati *E. faecalis* appartenenti ai sequence type: ST16 (A) e ST27 (B). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

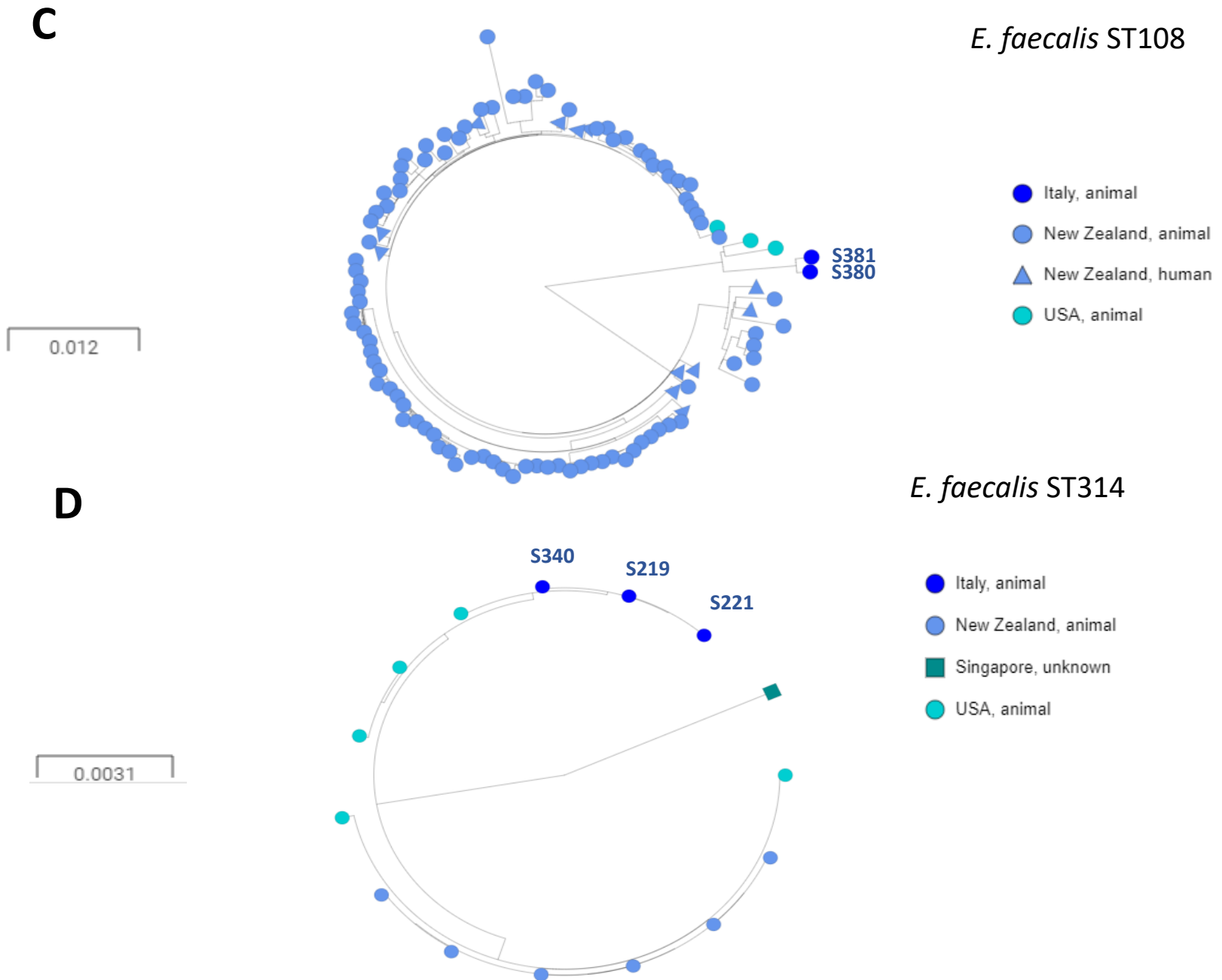


Figura 27. Alberi filogenetici degli isolati *E. faecalis* appartenenti ai sequence type: ST108 (C) e ST314 (D). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

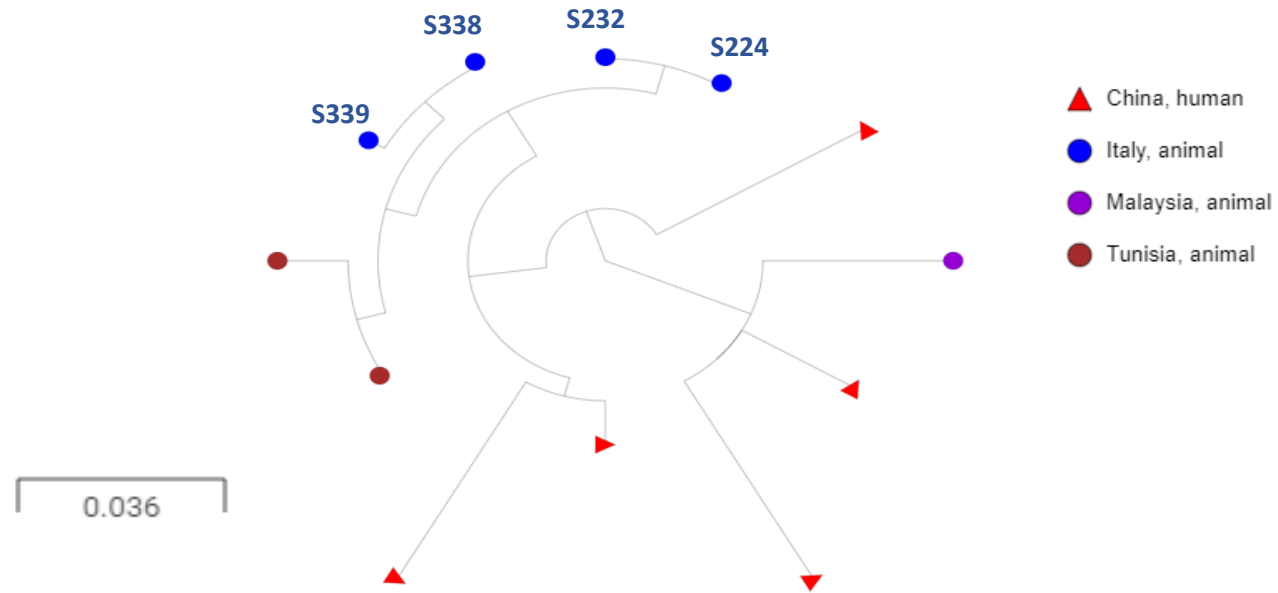
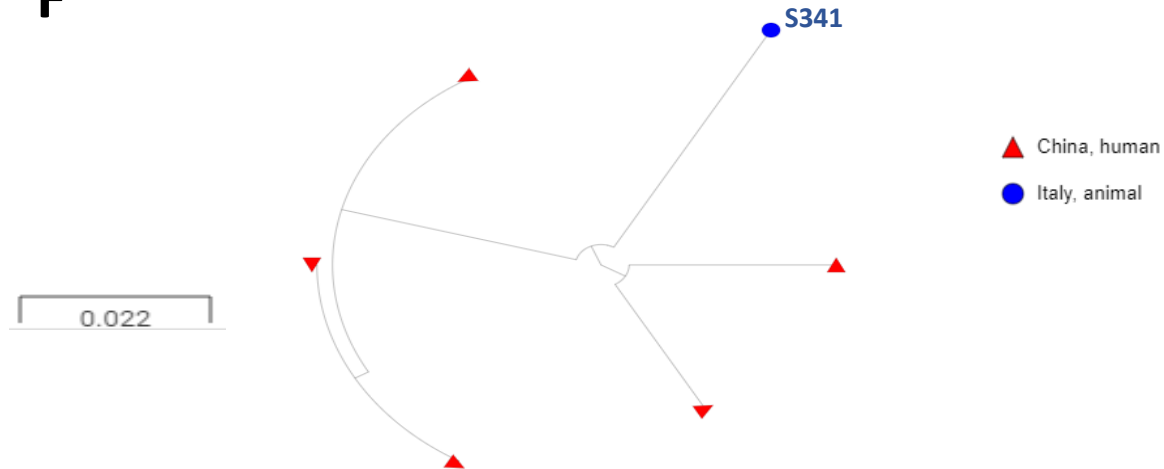
E*E. faecalis* ST476**F***E. faecalis* ST585

Figura 28. Alberi filogenetici degli isolati *E. faecalis* appartenenti ai sequence type: ST476 (E) e ST585 (F). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

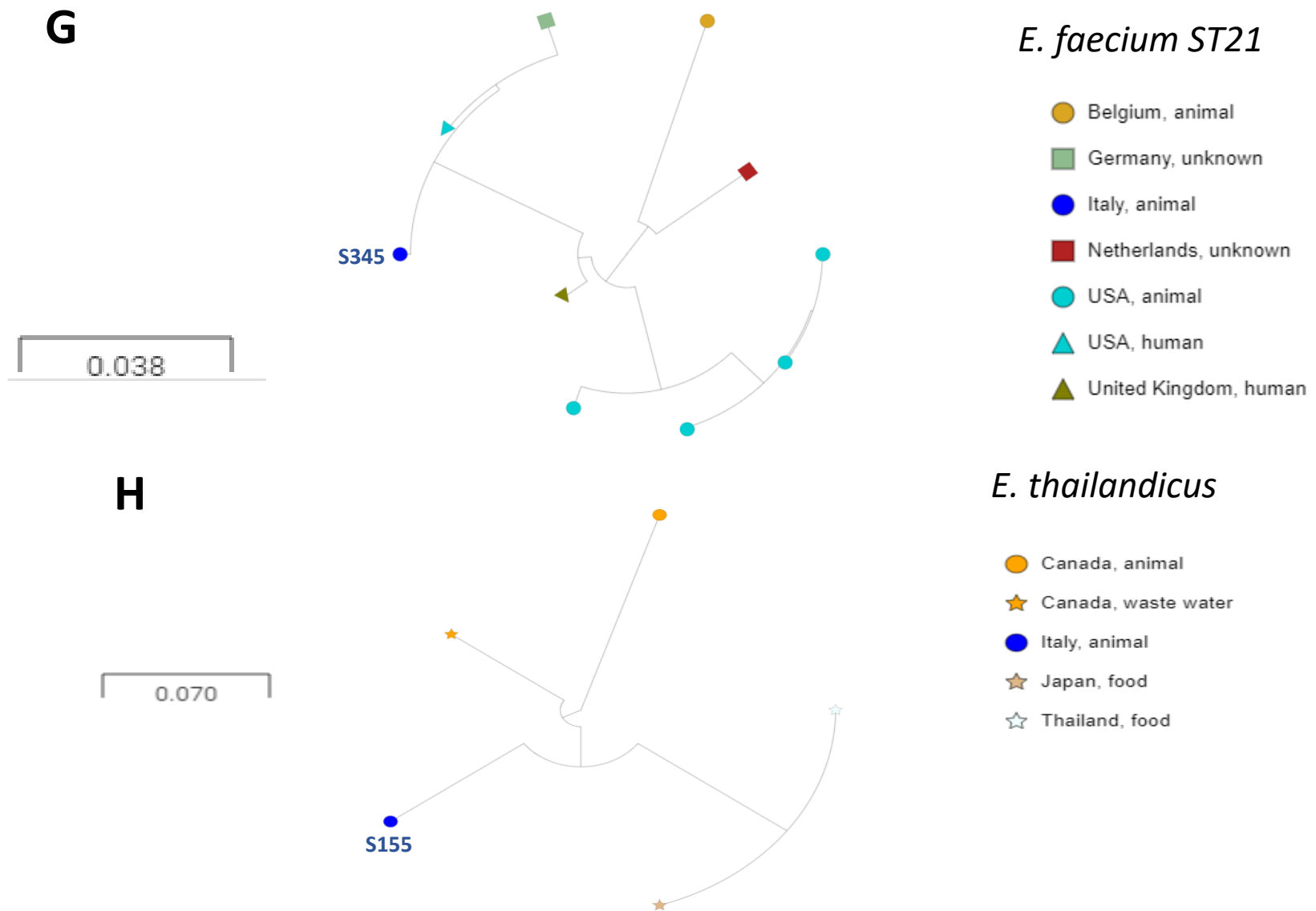


Figura 29. Alberi filogenetici degli isolati *E. faecium* appartenenti al sequence type: ST21 (G) ed *E. thailandicus* (F). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

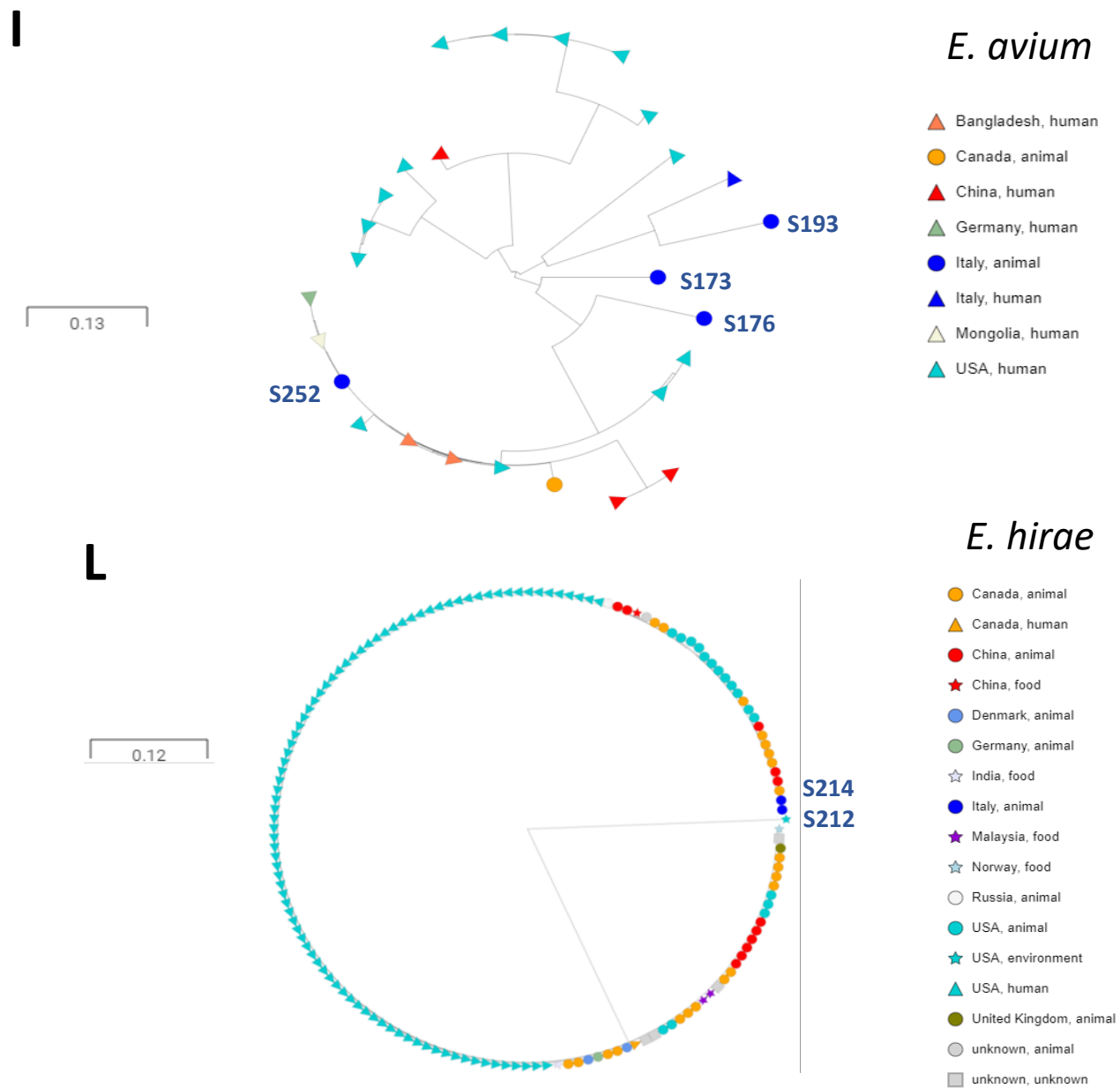


Figura 30. Alberi filogenetici degli isolati appartenenti ad *E. avium* (I) ed *E. hirae* (L). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

M

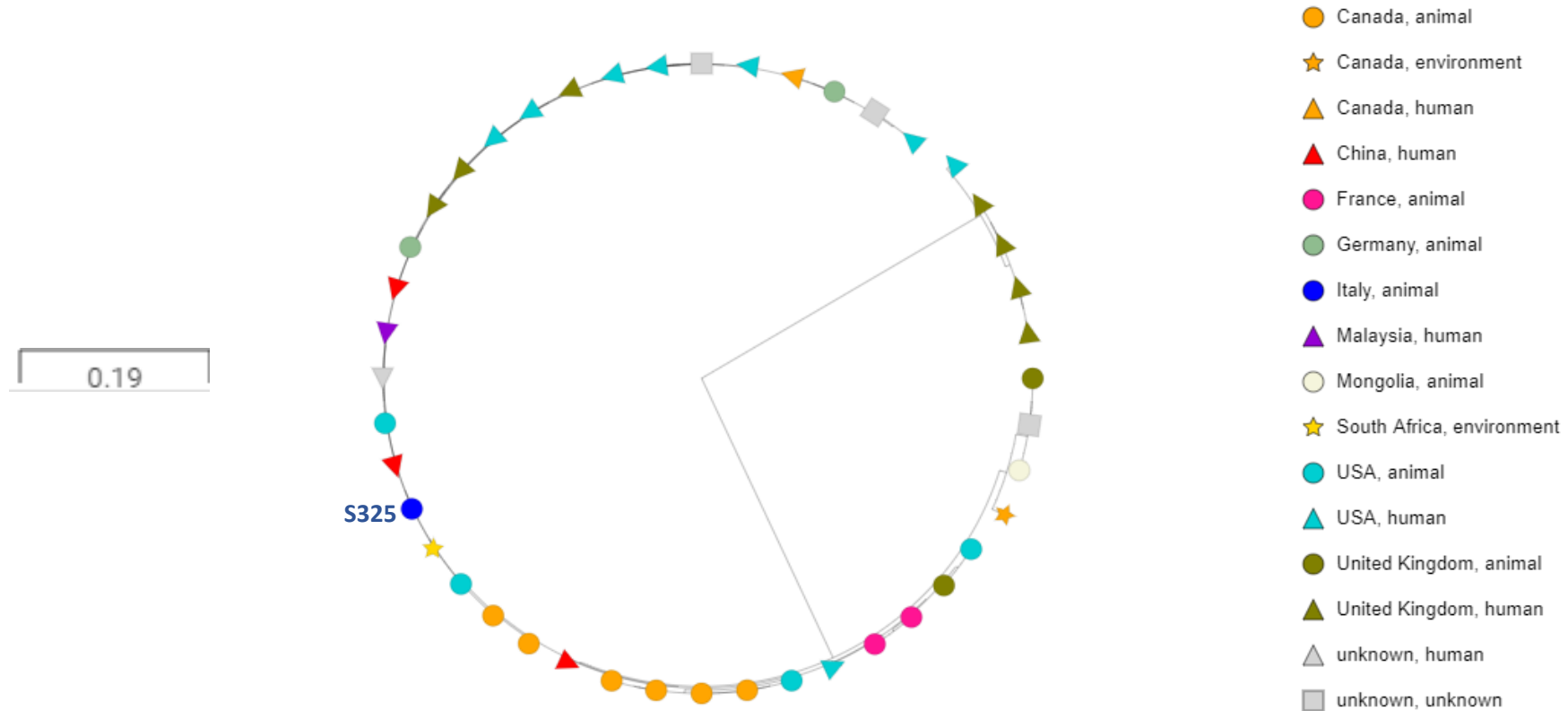


Figura 31. Albero filogenetico dell'isolato *E. gallinarum* (M). A destra è riportata la provenienza e l'origine degli isolati correlati. I ceppi oggetto di questo studio sono rappresentati da un pallino blu al quale corrisponde il codice identificativo.

3.3 Localizzazione dei determinanti di resistenza agli oxazolidinoni e instabilità dei contesti genetici

Mediante esperimenti di S1-PFGE, associata a Southern-blot e ibridazione, è stato possibile determinare la localizzazione genica dei determinanti di linezolid-resistenza negli isolati oggetto di questo studio. Nella maggior parte dei ceppi i geni si presentavano in più copie, localizzati sia a livello cromosomico che su uno o più plasmidi di diverse dimensioni.

La sola localizzazione plasmidica del gene *optrA* è stata riscontrata in 9 isolati, le dimensioni dei plasmidi variavano da ~ 48 kb a ~ 240 kb. In 7 ceppi il determinante di antibiotico resistenza era presente solo a livello cromosomico mentre nei rimanenti 7 campioni si visualizzava un doppio segnale a livello cromosomico e plasmidico (Figura 32). Le dimensioni dei plasmidi contenenti *optrA* erano comprese fra le ~ 30 kb e le ~ 240 kb.

È stata inoltre studiata l'instabilità del contesto genetico di *optrA* in tutti e 23 i ceppi positivi per questo determinante di resistenza. La presenza di forme circolari è stata osservata in 17/23 isolati.

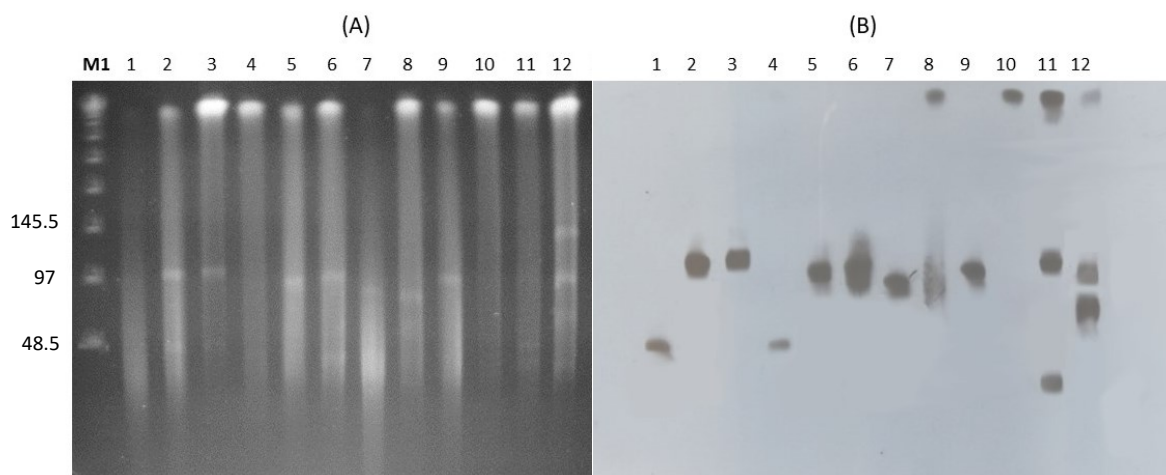


Figura 32. S1-PFGE (A) e ibridazione di alcuni ceppi con la sonda per il gene *optrA* (B): 1 S176; 2 S183; 3 S184; 4 S193; 5 S217; 6 S219; 7 S221; 8 S224; 9 S251; 10 S252; 11 S155; 12 S157. M1, marker Lambda (Promega, Madison, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker lambda espresse in kb.

In cinque dei sei enterococchi testati, il gene *cfr* era localizzato su plasmidi di dimensioni pari a ~ 97 kb (n = 1 isolato), ~ 48 kb (n = 3 isolati) o ~ 23 kb (n = 1 isolato); solo in un ceppo, *cfr* mostrava una localizzazione cromosomica (Figura 33). Tutti gli isolati risultavano essere negativi per la presenza di intermedi circolari.

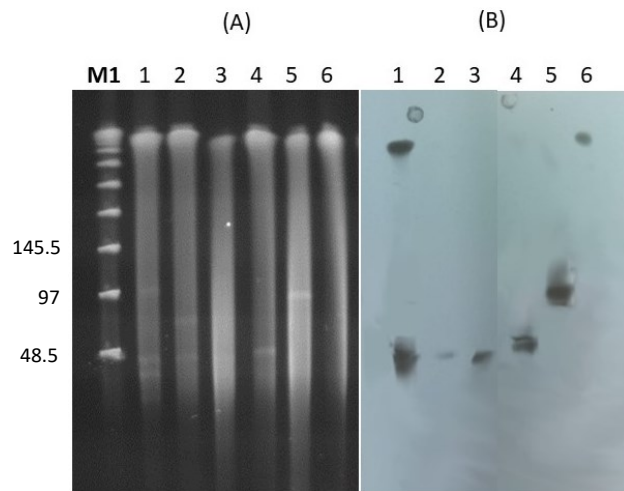


Figura 33. S1-PFGE (A) e ibridazione di alcuni ceppi con la sonda per il gene *cfr*(B): 1 S155; 2 S173; 3 S176; 4 S232; 5 S251; 6 S252. M1, marker Low Range PFG (New England Biolabs, Ipswich, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

Il gene *cfr*(D) è stato rilevato su plasmidi di ~ 30 e ~ 80 kb (n = 1 isolato) e ~ 34 kb (n = 2 isolati). In tutti i ceppi, il gene aveva anche una posizione cromosomica (Figura 34). Non è stata rilevata alcuna forma circolare.

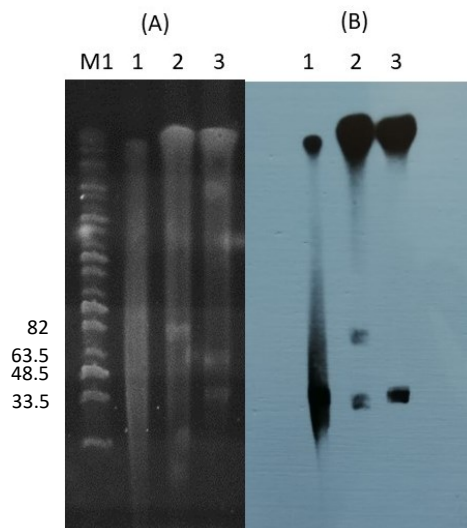


Figura 34. S1-PFGE (A) e ibridazione di alcuni ceppi con la sonda per il gene *cfr*(D) (B): 1 S193; 2 S221; 3 S377. M1, marker MiddleRange PFG (New England Biolabs, Ipswich, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

In tutti gli enterococchi risultati essere positivi per il gene *poxA*, tranne uno, è stata rilevata una localizzazione plasmidica del determinante di antibiotico resistenza; 5/7 isolati hanno mostrato una doppia reazione di ibridazione su plasmidi di dimensioni diverse (~ 30 - ~ 97 kb e ~ 30 - ~ 150 kb). In due isolati, *poxA* era localizzato sia su un plasmide di ~ 97 kb che sul cromosoma (Figura 35). In tutti gli enterococchi *poxA*-positivi sono state rilevate forme circolari del determinante di resistenza.

Quattro ceppi mostravano una co-localizzazione dei determinanti di resistenza al linezolid: (i) *optrA* e *cfr* erano localizzati in un plasmide da ~ 48 kb in *E. avium* S176 e in un plasmide da ~ 97 kb in *E. faecalis* S251; (ii) in *E. faecium* S157, *optrA* e *poxA* erano localizzati sugli stessi plasmidi di ~ 30 e ~ 97 kb; (iii) in *E. faecalis* S221 *optrA* e *cfr(D)* erano co-localizzati su un plasmide di ~ 80 kb.

Tutti i risultati finora descritti sono riportati in tabella 9.

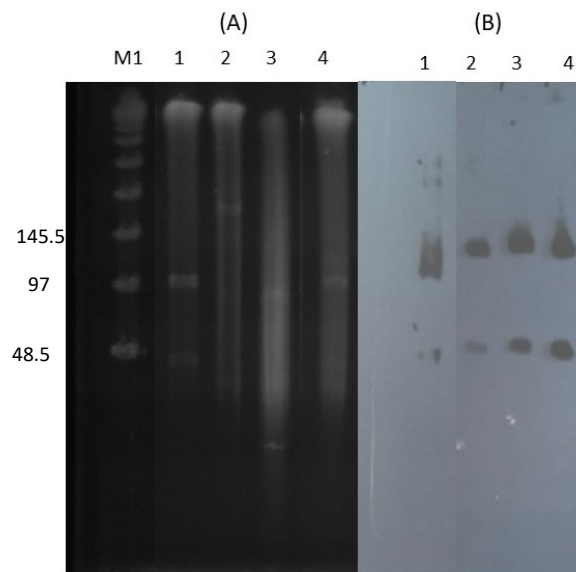


Figura 35. S1-PFGE (A) e ibridazione di alcuni ceppi con la sonda per il gene *poxA* (B): 1 S184; 2 S193; 3 S146; 4 S214. M1, marker Lambda (Promega, Madison, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

3.4 Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni

La trasferibilità dei geni *cfrr*, *cfrr(D)*, *optrA* e *poxtA* è stata saggiata mediante esperimenti di coniugazione su filtro, impiegando come donatori i 30 isolati florfenicolo-resistenti positivi per almeno un gene di resistenza agli oxazolidinoni e come riceventi *E. faecium* 64/3 e *E. faecalis* JH2-2. Sono stati realizzati incroci intraspecifici (fatta eccezione per i campioni S183, S297 e S214) e interspecifici con gli isolati appartenenti alle specie enterococciche minori. Non tutti i donatori hanno mostrato la capacità di trasferire i determinanti di resistenza agli oxazolidinoni nelle condizioni adottate in questo studio. Sette su 23 isolati positivi per il gene *optrA* hanno trasferito il gene da solo (n = 4 isolati) o in associazione con *cfrr* (n = 1 isolato), con *cfrr(D)* (n = 1 isolato) o con *poxtA* (n = 1 isolato). Cinque dei sette enterococchi *poxtA*-positivi erano in grado di trasferire questo gene di resistenza al linezolid da solo (n = 4) o in associazione con *optrA* (n = 1) ai riceventi *E. faecalis* JH2-2 o *E. faecium* 64/3.

Le MIC e i genotipi sia dei transconiuganti che dei donatori e le frequenze di trasferimento sono indicate in Tabella 9.

Tabella 9. Fenotipo e genotipo di donatori, transconiuganti e riceventi. Localizzazione dei geni di resistenza al linezolid.

Donatore/Transconiugante	Ricevente	Frequenza	MICs (mg/L)			Genotipo				Localizzazione genica			
			FFC ^a	CHL	LZD	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>cfrD</i>	<i>poxtA</i>	<i>optrA</i>	<i>cfr</i>	<i>cfrD</i>	<i>poxtA</i>
<i>E. faecalis</i> S183	<i>E. faecium</i> 64/3	ND ^b	32	64	2	+	-	-	-	100 ^{c(+)} ^d	-	-	-
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.1 x 10 ⁻²											
TC1			32	64	2	+	-	-	-				
TC2			32	64	2	+	-	-	-				
<i>E. faecalis</i> S184	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.6 x 10 ⁻²	64	128	2	+	-	-	-	100(+)	-	-	-
TC3			32	128	4	+	-	-	-				
TC6			32	128	4	+	-	-	-				
<i>E. faecalis</i> S217	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	32	64	2	+	-	-	-	90(+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S219	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	32	128	4	+	-	-	-	90(+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S221	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	32	64	2	+	-	+	-	80(+)	-	c, 30, 80(-)	-
<i>E. faecalis</i> S224	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	64	128	4	+	-	-	-	c ^e (+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S232	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	128	128	2	+	-	-	-	c, 90(+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S338	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	64	64	1	+	-	-	-	c(-)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S339	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	128	>128	4	+	-	-	-	c(+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S340	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	128	>128	4	+	-	-	-	c(+)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S341	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	>128	>128	8	+	-	-	-	c(-)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S377	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	32	32	4	+	-	+	-	c, 40(+)	-	c, 34(-)	-
<i>E. faecalis</i> S380	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	64	128	4	+	-	-	-	70(-)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S381	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	128	128	2	+	-	-	-	c, 70, 90(-)	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S251	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	64	16	4	+	+	-	-	97(+)	97(-)	-	-
<i>E. faecium</i> S156	<i>E. faecium</i> 64/3	3.5 x 10 ⁻⁴	>128	32	8	-	-	-	+	-	-	-	30, 97(+)
1A1			128	32	8	-	-	-	+				
1A2			128	32	8	-	-	-	+				
<i>E. faecium</i> S157	<i>E. faecium</i> 64/3	4.6 x 10 ⁻⁴	>128	32	8	+	-	-	+	c, 30, 50, 97(+)	-	-	30, 97(+)
1B1			128	32	8	+	-	-	+				
1B2			128	32	8	+	-	-	+				
<i>E. faecium</i> S194	<i>E. faecium</i> 64/3	3.7 x 10 ⁻⁴	64	16	4	-	-	-	+	-	-	-	30, 97(+)
TC21			64	16	4	-	-	-	+				
TC22			64	16	4	-	-	-	+				
<i>E. faecium</i> S195	<i>E. faecium</i> 64/3	7.3 x 10 ⁻²	64	16	2	-	-	-	+	-	-	-	30, 150(+)

TC6			64	16	4	-	-	-	+				
TC8			64	16	4	-	-	-	+				
<i>E. faecium</i> S297	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	>128	64	4	+	-	-	-	240(+)	-	-	-
	<i>E. faecium</i> 64/3	1.8 x 10 ⁻⁴											
TC36			64	64	2	+	-	-	-				
TC37			64	64	2	+	-	-	-				
<i>E. faecium</i> S345	<i>E. faecium</i> 64/3	1.8 x 10 ⁻³	128	>128	4	+	-	-	-	c, 45, 150(+)	-	-	-
TC25			128	64	4	+	-	-	-				
TC27			128	64	4	+	-	-	-				
<i>E. faecium</i> S356	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	>128	64	4	-	-	-	+	-	-	-	c(+)
<i>E. hirae</i> S212	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	128	64	8	-	-	-	+	-	-	-	97(+)
<i>E. hirae</i> S214	<i>E. faecium</i> 64/3	1.3 x 10 ⁻³	128	32	8	-	-	-	+	-	-	-	30, 97(+)
TC9			64	32	8	-	-	-	+				
TC12			64	32	8	-	-	-	+				
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND											
<i>E. avium</i> S173	<i>E. faecalis</i> JH2-2	6.1 x 10 ⁻³	32	32	1	-	+	-	-	-	48(-)	-	-
TC1			16	32	1	-	+	-	-				
TC2			16	32	1	-	+	-	-				
<i>E. avium</i> S176	<i>E. faecium</i> 64/3	7 x 10 ⁻⁵	32	16	2	+	+	-	-	48(+)	48(-)	-	-
1C1			64	16	4	+	+	-	-				
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.5 x 10 ⁻³											
TC1			64	16	4	+	+	-	-				
TC2			64	16	4	+	+	-	-				
<i>E. avium</i> S193	<i>E. faecalis</i> JH2-2	1.1 x 10 ⁻⁴	16	16	1	+	-	+	-	c, 48(-)	-	c, 34(-)	-
TC4			16	32	0.5	+	-	+	-				
TC5			16	32	0.5	+	-	+	-				
<i>E. avium</i> S252	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	32	16	4	+	+	-	-	c(-)	c(-)	-	-
<i>E. gallinarum</i> S325	<i>E. faecalis</i> JH2-2	ND	64	64	0.5	+	+	-	-	c(+)	23(-)	-	-
<i>E. thailandicus</i> S155	<i>E. faecium</i> 64/3	ND	>128	>128	4	+	+	-	-	c, 25, 97(+)	48(-)	-	-

^a FFC, florfenicolo; CHL, cloramfenicolo; LZD, linezolid;

^b ND, frequenza non rilevabile alle condizioni sperimentali utilizzate;

^c dimensioni plasmidiche in kb;

^d presenza (+) o meno (-) dell'intermedio circolare;

^e c, cromosoma.

3.5 Analisi dei contesti genetici

Lo studio dei dati risultanti dal WGS dei 30 enterococchi florfenicolo-resistenti, ha permesso di identificare, per ogni ceppo, i *contig* recanti almeno un gene di resistenza al linezolid. Di ogni nodo è stato studiato il contesto genetico dei geni *optrA*, *cfi*, *cfi(D)* e *poxtA*, mostrato nelle Figure 36–42. Le informazioni relative alla localizzazione genica sono riportate in Tabella 9.

3.5.1 Contesto genetico di *optrA*

Le analisi dei contesti genetici *optrA* hanno evidenziato un'elevata variabilità genetica per cui tutti gli intorni del gene sono stati classificati in sei diverse tipologie: A (n = 11 isolati), B (n = 5 isolati), C (n = 2 isolati), D (n = 1 isolato), E (n = 2 isolati) e F (n = 2 isolati) (Figura 36-39).

- TIPO A: Il contesto genetico *optrA* rilevato in S377 era identico al trasposone Tn6628 di pE35048-oc (Morrone *et al.*, 2018) (Figura 36-A);

Sette enterococchi mostravano la presenza di un Tn6628-like dove una delle due ISEfa15, quella a monte di *optrA* in S176, e quello a valle di *optrA* in S183, S184, S217, S219, S221 e S345, era troncata.

Nel ceppo S340 il trasposone Tn6628 era completamente riarrangiato, infatti le due ISEfa15 erano invertite rispetto al trasposone *wild-type* e una delle due trasposasi a valle di *optrA* era mancante.

Negli isolati S193 e S155 la regione contenente il gene *optrA* era priva degli elementi ISEfa15, tuttavia nel primo ceppo anziché essere localizzata all'interno del gene ζ , come precedentemente osservato nel plasmide pE35048-oc (Morrone *et al.*, 2018), era inserita tra il gene *erm(B)* e il gene intatto codificante la tossina ζ . Nel secondo ceppo la regione a valle del gene *optrA* mostrava un'elevata identità nucleotidica con i primi sei geni del plasmide pE35048-oc (Morrone *et al.*, 2018).

- Tipo B: Quattro enterococchi (S224, S232, S338 e S339) avevano un contesto del gene *optrA* cromosomico, (inserito nel gene *radC*), che mostrava un alto livello d'identità nucleotidica (99%) con il trasposone cromosomico Tn6674 di *E. faecalis* di origine suina (numero di accesso MK737778). In questo frammento *optrA* è strettamente associato al gene *fexA* (responsabile della resistenza ai fenicoli) e al

trasposone Tn554 portante i determinanti di resistenza *erm(A)* (responsabile della resistenza ai macrolidi, lincosamidi e streptogramine di gruppo B) e *spc* (responsabile della spectinomycin-resistenza) (Figura 36-B).

Un Tn6674-like è stato rilevato anche nel ceppo S325 sempre inserito nel gene *radC*. Tuttavia, questo trasposone era più piccolo rispetto al *wild-type* a causa della perdita della regione contenente il gene *fexA* (2.475 bp) rimpiazzata da un frammento di DNA (1.439 bp) contenente un gene codificante una proteina ipotetica (Figura 36-B).

TIPO C: Il contesto *optrA* (13.168 bp) dell'isolato S297, inserito nel gene *radC*, mostrava due trasposasi (*tnpA* e una *tnpB* troncata) e una ORF codificante per un regolatore trascrizionale (*araC*) a monte del gene *optrA*. A valle *optrA* era associato ad un *erm(A)*-like e al gene *met* codificante una metilasi. Tutto l'intorno genetico di *optrA* mostrava un alto grado di identità nucleotidica (99%) con la regione cromosomica di *E. faecalis* LY4 (numero di accesso KT862785.1) (Figura 36-C) (He *et al.*, 2016). Una regione contenente i geni *optrA* ed *erm(A)*-like è stata anche identificata in *E. faecalis* S341; tuttavia, in questo isolato, il contesto genetico di *optrA*, incluso anche il gene *fexA*, era fiancheggiato da due IS1216 con orientamento opposto (Figura 36-C).

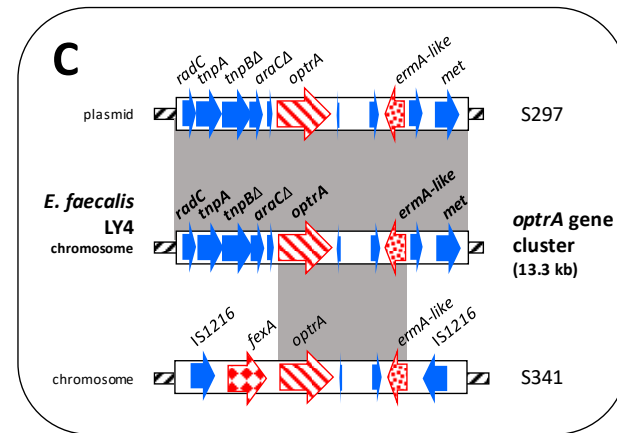
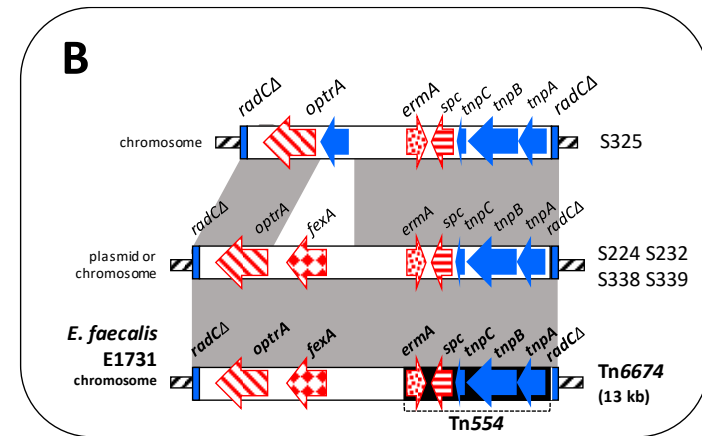
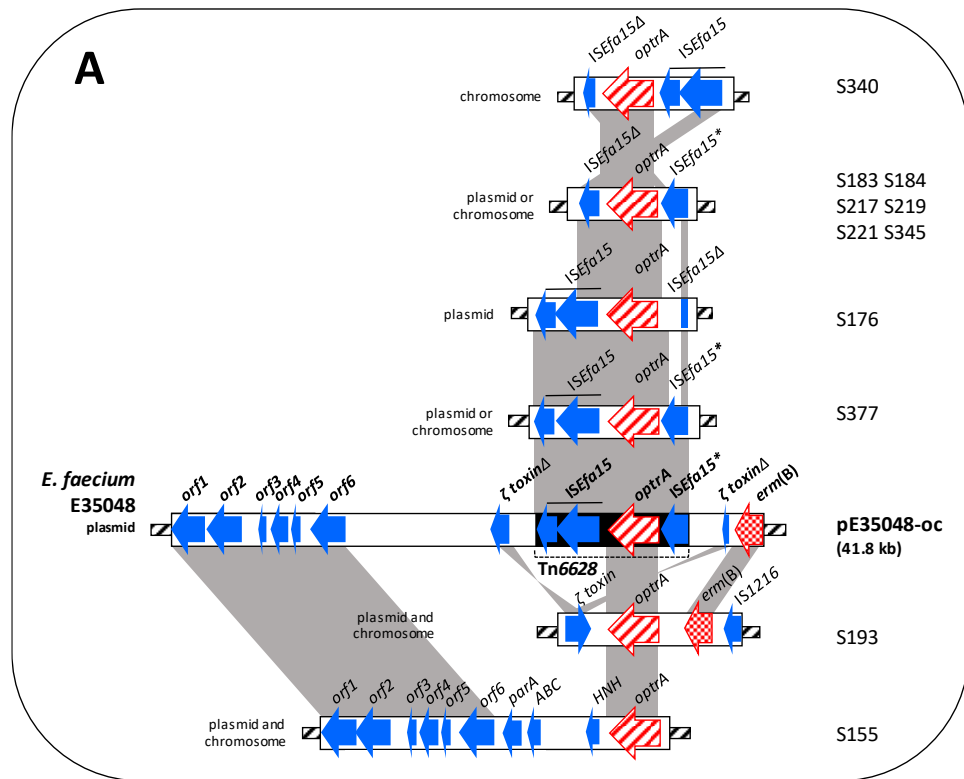


Figura 36. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *optrA* rispetto a elementi genetici noti (mostrati in grassetto): pE35048-oc di *E. faecium* E35048, (A); Tn6674 di *S. aureus* AOUC-0915, (B); cluster genico cromosomico *optrA* di *E. faecalis* LY4, (C). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati con frecce rosse con diverso riempimento. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *optrA* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

- TIPO D: In S157, il gene *optrA*, era localizzato in una regione contenente una IS1542, una ricombinasi (*res*) e il trasposone Tn558 portante il gene *fexA*. Questa ampia regione di 13.226 bp mostrava un alto grado di identità nucleotidica con due aree cromosomiche di *Staphylococcus sciuri* wo33-13 contenenti rispettivamente *optrA* e il trasposone Tn558 (numero di accesso KX982174.1) (Fan *et al.*, 2017). Tuttavia, nel ceppo S157, queste due regioni erano invertite rispetto a quelle presenti nel cromosoma di *S. sciuri* wo33-13 (Figura 37).

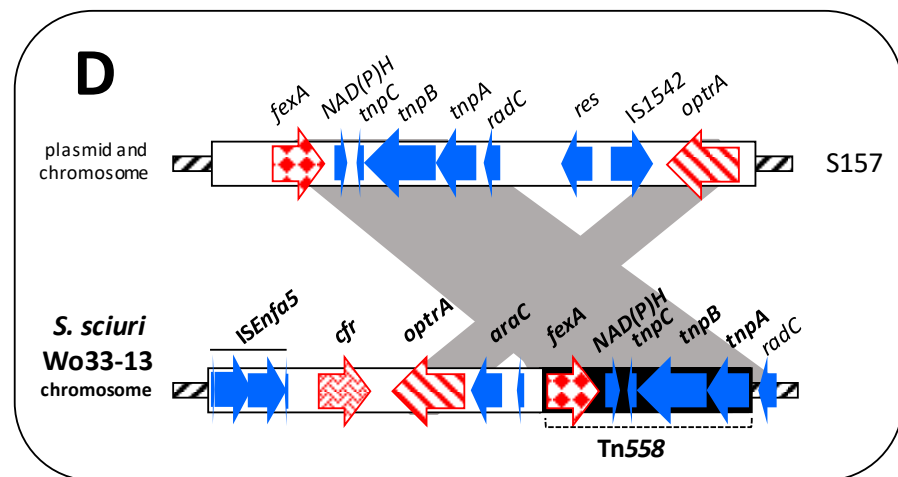


Figura 37. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *optrA* tipologia D rispetto al contesto cromosomico riscontrato in *S. sciuri* Wo33-13. Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati con frecce rosse con diverso riempimento. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *optrA* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

- TIPO E:** Questo tipo di contesto genetico è stato identificato in due isolati S251 e S252 e mostrava la presenza di due IS1216 con lo stesso orientamento. A monte di *optrA* era presente il gene *aph(2'')-IIIa* (responsabile delle resistenza agli aminoglicosidi), mentre a valle era identificata una trasposasi (*tnpA*), un gene associato alla bleomicina-resistenza (*ble*) e una regione portante il gene *cfr* quest'ultimo fiancheggiato da due diversi tipi di trasposasi (*istA/istB* e una *tnpA*) (Figura 38).

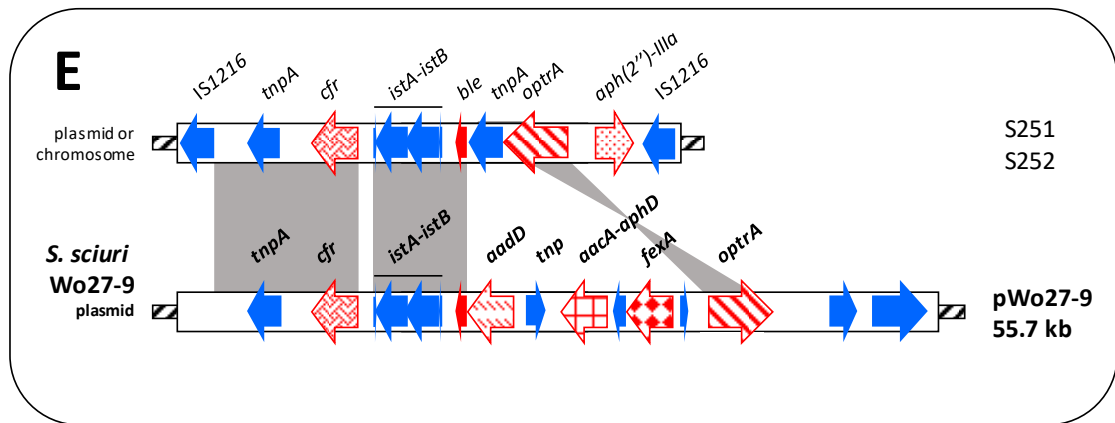


Figura 38. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *optrA* tipologia E rispetto al contesto riscontrato in pWo27-9 di *S. sciuri* Wo27-9. Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati con frecce rosse con diverso riempimento. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *optrA* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

- TIPO F: Un contesto genetico *optrA* pari a 12.345 bp, fiancheggiato da due *IS1216* con un orientamento opposto, è stato rilevato negli isolati S380 e S381. In questa regione *optrA* era strettamente associato a due geni di resistenza: *erm(A)* (a valle del gene) e *InuG* (a monte del gene e codificante una lincosamide nucleotidiltransferasi). Due regioni del nodo mostravano un alto grado di identità nucleotidica (99%) con le corrispondenti porzioni presenti nel plasmide pE035 di *E. faecalis* E035 (numero di accesso MK140641.1) (Figura 39) (Hao *et al.*, 2019).

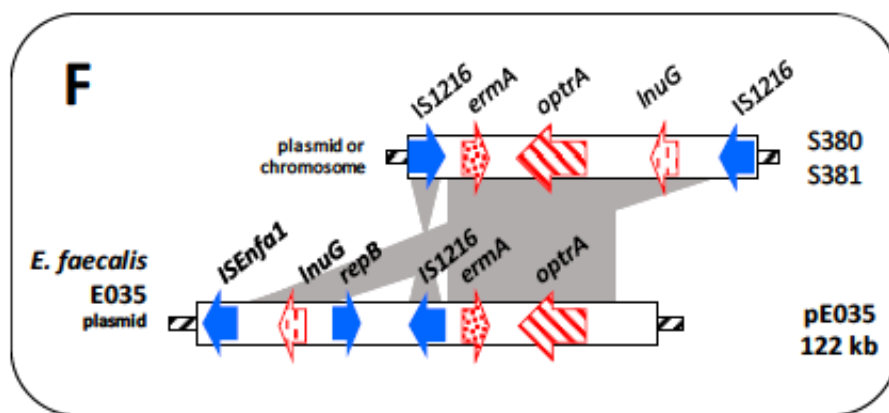


Figura 39. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *optrA* tipologia F rispetto al contesto riscontrato in pE035 da *E. faecalis* E035. Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati con frecce rosse con diverso riempimento. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *optrA* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

3.5.2 Contesti genetici dei geni *cfv* e *cfv*(D)

Il contesto del gene *cfv* rilevato nel ceppo S176 mostrava un alto grado di identità nucleotidica (99%) con una porzione, contenente una copia di *ISEnfa5* e del gene *cfv*, del trasposone Tn6644 presente nel trasposone cromosomico Tn6394 di *Staphylococcus aureus* AOUC-0915 (numero di accesso MH746818.1) (Figura 40) (D'Andrea *et al.*, 2019).

Nell'isolato S325, la regione che includeva il gene *cfv* mostrava un alto livello di identità nucleotidica (99%) a due diverse aree: (i) la regione (di 6.5 kb) contenente una porzione del trasposone Tn558, veicolante il gene *fexA*, presente nel plasmide di *S. epidermidis* p12-02300 (numero di accesso KM521837.1) (Bender *et al.*, 2015); (ii) una regione portante *cfv* in Tn6644 di *S. aureus* AOUC-0915 (D'Andrea *et al.*, 2019); tuttavia, a monte del gene *cfv* era rilevato un elemento *ISEnfa5* troncato a causa di una delezione di 396 bp nella prima trasposasi (Figura 40).

L'intorno genetico di *cfv* (10.990 bp) in S173 era compreso tra due *IS1216* aventi la stessa polarità e mostrava delle similarità nucleotidiche con il plasmide p12-2300 (Bender *et al.*, 2015). Tuttavia, in S173 si osservava la presenza di un Tn558 troncato per l'assenza della trasposasi *tnpA* e contrariamente a quanto evidenziato in p12-2300 il gene *cfv* era localizzato a monte della trasposasi *tnpB* di Tn558 e associato ad una ricombinasi (*rec*) (Figura 40).

Nell'isolato S155 il contesto genetico di *cfv* (8.462 bp) era fiancheggiato da due *IS11N* con lo stesso orientamento e come evidenziato in S173 anch'esso mostrava identità nucleotidiche con il plasmide p12-2300 (Bender *et al.*, 2015). Tuttavia, in questa regione il gene *cfv* era localizzato a valle di un Tn558 troncato, poiché privo delle trasposasi *TnpA* e *tnpB* e i geni *cfv* e *fexA* mostravano un orientamento opposto rispetto alla corrispondente regione del plasmide p12-2300 (Figura 40). I contesti *cfv* degli isolati S251 e S252 sono stati descritti nel paragrafo relativo allo studio dei contesti *optrA* e mostrati nella Figura 38.

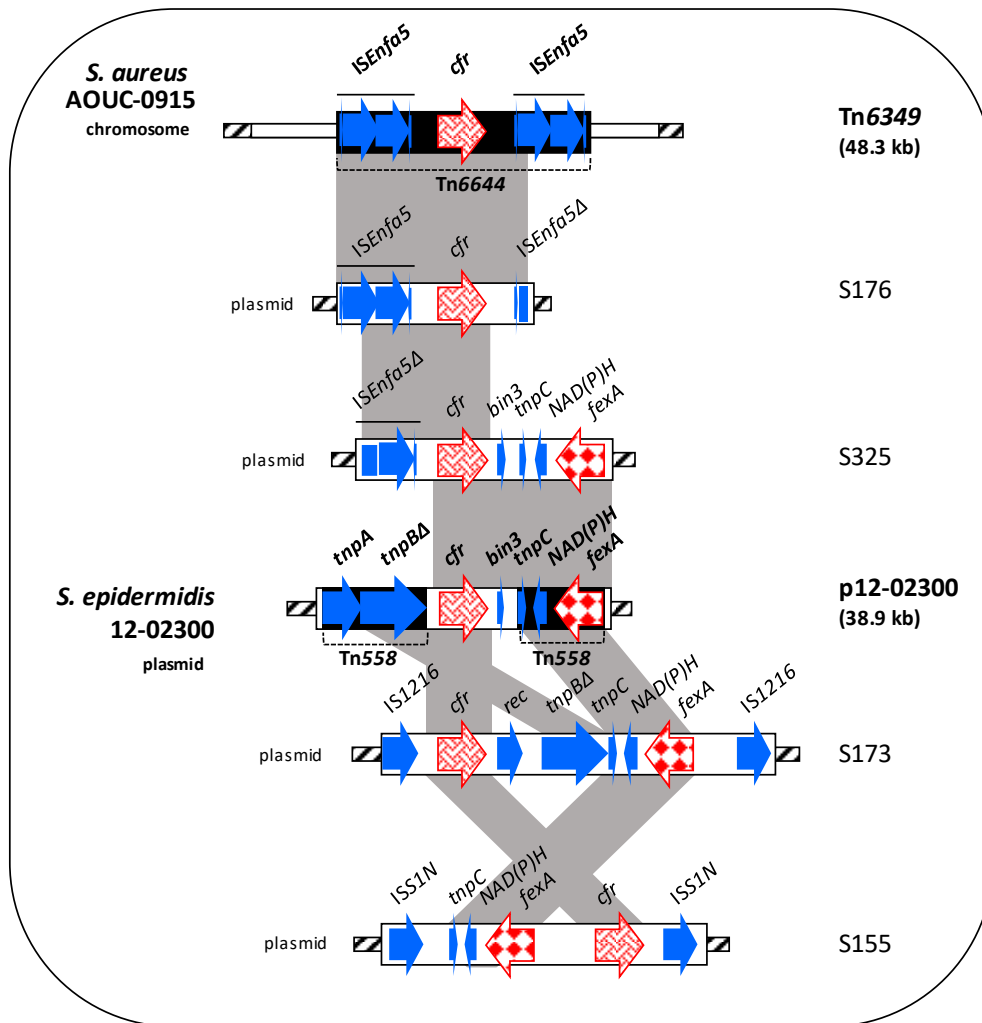


Figura 40. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico di *cfr* dei 4/6 enterococchi *cfr*-positivi rispetto ad elementi genetici noti (mostrati in grassetto). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I geni di antibiotico resistenza sono indicati con frecce rosse con diversi riempimenti. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. Nel riquadro sono mostrate la localizzazione di *cfr* (a sinistra) e gli isolati (a destra). I contesti genetici *cfr* degli isolati S251 e S252 sono mostrati nella Figura 38.

Il contesto *cfrr(D)*, identificato negli isolati *E. faecalis* S221 e *E. hirae* S193, era identico alla regione corrispondente del plasmide 4 di *E. faecium* E8014 ad eccezione di una sequenza di inserzione a monte del gene *guaA* codificante una GMP sintetasi (IS1N invece di IS1216) (Guerin *et al.*, 2020). In *E. faecalis* S337 l'intorno genetico di *cfrr(D)* era fiancheggiato dagli elementi Δ IS1E e IS1A e mostrava la presenza di un gene *guaA* troncato a valle di *cfrr(D)* (Figura 41).

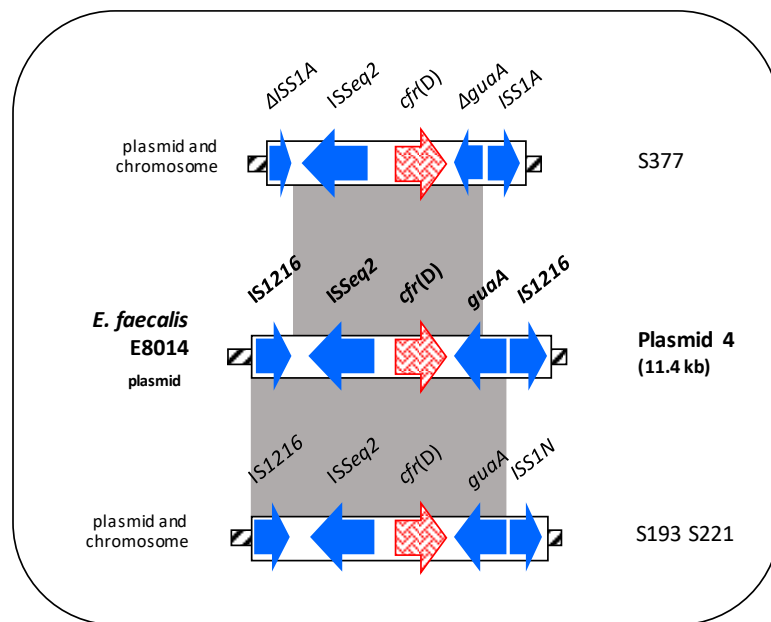


Figura 41. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *cfrr(D)* dei 3 enterococchi recanti il gene rispetto a una regione del plasmide 4 di *E. faecalis* E8014 (mostrato in grassetto). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono identificati con frecce rosse. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. Nel riquadro sono riportate la localizzazione di *cfrr(D)* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

3.5.3 Contesto del gene *poxA*

Il contesto del gene *poxA* rilevato in 7 isolati (S156, S157, S194, S195, S356, S212, e S214) era sempre fiancheggiato da due IS *1216* aventi lo stesso orientamento ed era identico alla regione corrispondente nel trasposone Tn6657 di *S. aureus* AOUC-0915 (Figura 42) (D'Andrea *et al.*, 2019).

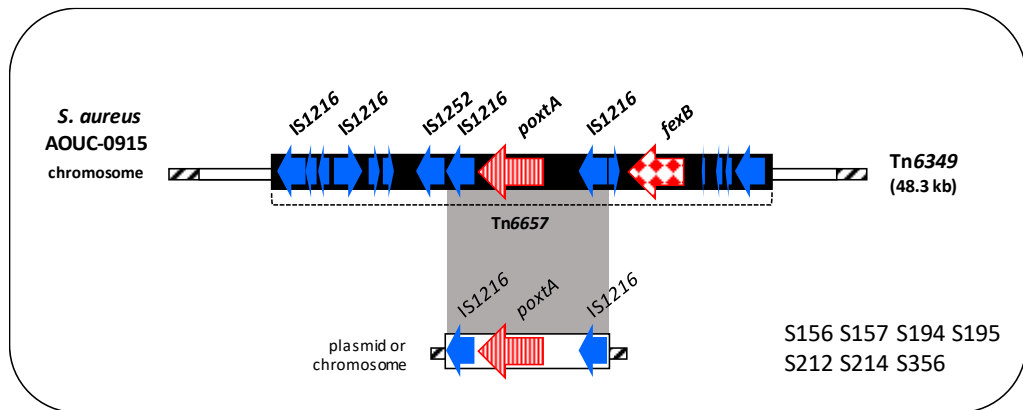


Figura 42. Rappresentazione schematica (non in scala) dell'ambiente genetico *poxA* dei 7 enterococchi recanti il gene rispetto al trasposone Tn6657 (mostrato in grassetto). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono identificati con frecce rosse con riempimenti diversi. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica >99%. Nel riquadro sono state mostrate la localizzazione di *poxA* (a sinistra) e gli isolati (a destra).

4. DISCUSSIONE

Lo sviluppo e l'impiego degli antibiotici, a partire dalla seconda metà del XX secolo, ha rivoluzionato l'approccio al trattamento e alla prevenzione delle malattie infettive e delle infezioni ritenute in passato incurabili. Tuttavia, malgrado siano state investite risorse ed energie al fine di aumentare la conoscenza dei meccanismi di resistenza e nella ricerca di molecole sempre più efficaci, la comparsa di resistenze agli antibiotici è al momento più veloce dello sviluppo di nuove molecole.

L'antibiotico resistenza rappresenta una vera e propria minaccia per la salute dell'uomo, si stima infatti che ogni anno 33 mila persone muoiono a causa di un'infezione complicata da batteri MDR.

In un periodo segnato dalla preoccupante emergenza di antibiotico-resistenze nei batteri Gram-negativi, la resistenza agli oxazolidinoni rappresenta oggi probabilmente la più grave minaccia tra i patogeni Gram-positivi. Il linezolid, primo membro di questa classe di farmaci, esibisce tutta una serie di proprietà ottimali (microbiologiche, farmacocinetiche, farmacodinamiche, tossicologiche e cliniche) che ne fanno uno dei farmaci più innovativi degli ultimi anni. La molecola viene utilizzata in ambito ospedaliero come "ultima risorsa" nel trattamento di gravi infezioni sostenute da batteri Gram-positivi multi-resistenti quali MRSA, VRE, pneumococchi e micobatteri MDR (Mendes *et al.*, 2018; Pfaller *et al.*, 2016). Il tedizolid, approvato dalla FDA nel 2014, condivide molte caratteristiche di base con il linezolid ma la sua maggior efficacia nei confronti dei patogeni Gram-positivi e i ridotti effetti collaterali, costituiscono un ulteriore passo in avanti nel trattamento di infezioni batteriche (Zhanel *et al.* 2015).

Nonostante la natura sintetica degli oxazolidinoni ceppi resistenti a causa di mutazioni ribosomiali (rRNA 23S e proteine L3/L4), sono tuttavia comparsi già un anno dopo l'approvazione del linezolid (Tsiodras *et al.*, 2001, Gonzales *et al.*, 2001). Sebbene le mutazioni restino ad oggi il meccanismo di resistenza prevalente, la comparsa di geni di resistenza potenzialmente trasferibili, come *cfr/cfr-like*, *optrA* e *poxtA*, è motivo di grave preoccupazione per la comunità scientifica.

Il gene *cfr*, codificante una metiltrasferasi, è riscontrato sia nei Gram-positivi che nei Gram-negativi (Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013) grazie ad un basso costo di fitness, alla presenza di varie sequenze di inserzione coinvolte nella mobilità del gene stesso e alla co-residenza sugli stessi elementi genetici con altri determinanti di resistenza che possono indurre la permanenza di *cfr* anche in assenza di pressione selettiva diretta (Shen *et al.*, 2013). Successivamente sono state identificate varianti del gene *cfr* [*cfr*(B), *cfr*(C), *cfr*(D) e *cfr*(E)] tutte in grado di esprimere il fenotipo PhLOPS_A (Deshpande *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2017; Guerin *et al.*, 2020; Stojkovic *et al.*, 2019).

Nel 2015 viene scoperto *optrA*, un nuovo gene di resistenza agli oxazolidinoni, il cui prodotto agisce da proteina di protezione ribosomiale (Sharkey *et al.*, 2016) conferendo resistenza a linezolid, tedizolid e ai fenicoli. Sorveglianze condotte in diverse aree geografiche, indicano che il gene è presente in isolati enterococcici sia di origine umana che animale (Wang *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2015; Deshpande *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2020). Recentemente *optrA* è stato anche rilevato in *C. coli*, un patogeno Gram-negativo di origine alimentare, che nei soli Stati Uniti è responsabile ogni anno di circa 1,5 milioni di infezioni e 270 milioni di dollari in spese mediche (Liu *et al.*, 2020).

Nel 2018 il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con la SOD di Microbiologia dell'azienda ospedaliera Careggi di Firenze, ha scoperto un nuovo determinante di resistenza agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid), ai fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo) e alle tetracicline denominato *poxtA*, in un MRSA isolato da una paziente statunitense con fibrosi cistica (Antonelli *et al.*, 2016, Antonelli *et al.*, 2018). Il gene *poxtA* codifica una proteina di protezione ribosomiale che mostra un'identità aminoacidica del 32% con OptrA (Antonelli *et al.*, 2018). Il gene è localizzato su un elemento mobile, Tn6349, che potrebbero contribuire alla sua diffusione nella popolazione batterica (D'Andrea *et al.*, 2019).

Poco dopo il gene è stato anche riscontrato in un isolato di *E. faecium* di origine suina (Brenciani *et al.*, 2018) e successivamente segnalato in enterococchi di origine animale, provenienti da diverse aree geografiche come Cina, Tunisia e Spagna (Lei *et al.*, 2019; Hao *et al.*, 2019; Helghaieb *et al.*, 2019; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019).

La capacità di questi geni di determinare resistenza non solo al linezolid ma anche ai fenicoli e la loro presenza in isolati di origine animale suggerisce che la loro selezione sia avvenuta in ambito animale proprio a causa del massiccio utilizzo di fenicoli in ambito veterinario.

Nel nostro paese non sono mai state condotte sorveglianze per monitorare la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in ceppi di origine animale, sebbene i dati sulle vendite di farmaci veterinari forniti dall'EMA (*European Medicines Agency*) indicano che in Italia il consumo di farmaci è molto più elevato rispetto ad altri stati europei (EMA, 2018).

Seppur limitato alla regione Marche, lo scopo dello studio è stato quello di fornire un quadro generale della presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi di origine suina nel nostro paese. Grazie al campionamento effettuato periodicamente in 76 allevamenti, in collaborazione con L'istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, è stato possibile isolare 145 enterococchi florfenicolo-resistenti.

Destano molta preoccupazione i dati derivanti dall'analisi genotipica visto che il 20,7% degli enterococchi florfenicolo-resistenti, possedeva almeno un gene di resistenza al linezolid. È anche importante sottolineare che non sono emerse divergenze significative nell'incidenza della resistenza al linezolid tra i ceppi isolati da allevamenti che non avevano fatto uso di florfenicolo e quelli che lo avevano somministrato nell'anno precedente il campionamento.

I risultati di PCR hanno evidenziato che *optrA* rimane il gene più diffuso e strettamente associato alla specie *E. faecalis* (15/15 isolati *optrA*-positivi), confermando il ruolo di *E. faecalis* come serbatoio per la diffusione del determinante di resistenza in ambito umano, come sottolineato da Deshpande *et al.* (Deshpande *et al.* 2018). Nei 23 isolati positivi ad *optrA* sono state inoltre identificate 9 varianti della proteina di cui cinque totalmente nuove, confermando l'enorme variabilità di questo gene (Morrone *et al.*, 2017). Il gene *cfi*, identificato solo in *E. faecalis* e in alcune specie enterococciche minori, è spesso associato al gene *optrA*; tuttavia, il suo ruolo nella resistenza agli oxazolidinoni nel genere

Enterococcus spp. è ad oggi oggetto di discussione (Deshpande *et al.*, 2018). Degno di nota è anche la presenza del nuovo gene *cfrr(D)* in due ceppi di *E. faecalis*, precedentemente identificato in isolati clinici di *E. faecium* ed *E. faecalis* in Francia e Spagna (Guerin *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2020), e per la prima volta in questo studio in un isolato di *E. avium* di origine suina.

Al contrario, il gene *poxA* risulta essere ampiamente presente in *E. faecium* e nelle specie enterococciche minori, dato rilevante considerando che in Italia, ad oggi, il determinante di resistenza è stato descritto solo in un MRSA clinico (Antonelli *et al.*, 2018) e in un enterococco isolato da suino (Brenciani *et al.*, 2019). Complessivamente questi risultati suggeriscono che *E. faecalis* può essere considerato come serbatoio per la diffusione di *optrA* ad altri batteri patogeni MDR, mentre il *background* genetico di *E. faecium* può essere a sua volta rilevante per la diffusione del gene *poxA* nella popolazione batterica, confermando quanto precedentemente evidenziato in letteratura (Deshpande *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2020).

L'analisi WGS delle relazioni filogenetiche degli isolati in esame ed il confronto con cloni internazionali già noti, mostra come i campioni siano strettamente correlati non solo con altri isolati di origine animale ma anche con enterococchi di origine umana ed ambientale presenti in diverse aree geografiche. È interessante notare come alcuni ceppi di *E. faecalis* siano stati identificati, non solo all'interno della stessa *farm*, ma anche in altri allevamenti, evidenziando una possibile diffusione di alcuni cloni enterococcici. Inoltre, la presenza di isolati di *E. faecalis* e di *E. faecium* di origine umana nei suini, alcuni appartenenti al complesso clonale CC17 (uno dei cloni *E. faecium* più diffusi in ambito nosocomiale), è motivo di preoccupazione poiché documenta una possibile trasmissione di ceppi multiresistenti tra animali ed esseri umani.

Negli enterococchi, la resistenza agli antibiotici è principalmente legata all'acquisizione di geni di resistenza localizzati su elementi genetici mobili quali i plasmidi coniugativi che risultano fondamentali nella diffusione dei determinanti di resistenza e svolgono un ruolo chiave nell'adattamento ambientale della popolazione enterococcica (Clewell DB *et al.*, 2014). In linea con quanto riportato sopra, dallo studio emerge un altro aspetto

decisamente allarmante ossia la localizzazione prevalentemente plasmidica dei geni e quindi la predisposizione di gran parte dei ceppi a trasferire, mediante coniugazione, i geni di resistenza agli oxazolidinoni a riceventi sensibili e con frequenze decisamente elevate. Motivo di particolare preoccupazione riguarda anche la presenza di plasmidi coniugativi contenenti più geni di resistenza, con diversi meccanismi d'azione, che possono essere responsabili di fenomeni di resistenza multipla.

Esperimenti di ibridazione hanno inoltre evidenziato una simultanea posizione (sia plasmidica che cromosoma) dei geni *cfr*, *optrA* e *poxtA* all'interno dello stesso ceppo batterico, suggerendo una loro probabile localizzazione su elementi genetici in grado di mobilizzarsi intracellularmente grazie alla presenza di sequenze di inserzione. L'analisi WGS ha infatti permesso di chiarire la natura dei contesti genetici contenenti i determinanti di resistenza agli oxazolidinoni mostrando *in primis* una grande variabilità dei contesti *optrA* identici o correlati ai trasposoni Tn6628 (Morrone *et al.*, 2018) e Tn6674 (Li *et al.*, 2019), plasmidi pE035 (Elghaieb *et al.*, 2019) e pWo27-9 (Fan *et al.*, 2017) e ad alcune regioni cromosomiche sia enterococciche che stafilococciche (He *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017). Nella stessa analisi genetica è apparso evidente come tutti gli intorni genetici di *cfr* presentavano alti livelli d'identità nucleotidica con il trasposone Tn6644 di *S. aureus* AOUC-0915 (D'Andrea *et al.*, 2019) e con una regione dal plasmide p12-2300 di *S. epidermidis* (Bender *et al.*, 2015). Per quanto riguarda il gene *cfr*(D) i contesti genetici sono risultati essere strettamente correlati ad una regione presente nel plasmide 4 di *E. faecium* E8014 recentemente descritta in Francia (Guerin *et al.*, 2020). Il gene *poxtA* è sempre invariabilmente identificato sul trasposone Tn6657 e fiancheggiato da elementi IS1216, appartenenti alla famiglia delle IS6, che risultano essere responsabili della sua diffusione.

Complessivamente, lo studio mostra come sia necessario eseguire delle sorveglianze anche in ambito animale per monitorare costantemente l'incidenza di antibiotico resistenza ed evidenzia come l'attuale situazione clinica sia solo la punta dell'iceberg di un quadro generale più preoccupante.

È noto come il florfenicolo (antibiotico non approvato per uso clinico) e le tetracicline siano ampiamente utilizzate in ambito veterinario per prevenire o curare infezioni batteriche negli animali. Ciò potrebbe favorire la diffusione, mediante meccanismi di co-selezione, non solo di geni di resistenza ai fenicoli e alle tetracicline, ma anche di determinanti di resistenza agli oxazolidinoni, con notevoli conseguenze per la salute pubblica. È interessante notare come il florfenicolo, una volta eliminato con le feci dagli animali, rimanga funzionalmente attivo, quindi in grado di esercitare una pressione selettiva anche nel suolo (Subbiah *et al.*, 2011).

Sebbene l'incidenza degli isolati resistenti al linezolid sia ancora alquanto bassa (Mendes *et al.*, 2018), desta grave preoccupazione l'esistenza di possibili serbatoi di geni di resistenza animali che potrebbero entrare nella catena alimentare che porta direttamente all'uomo e compromettere significativamente l'efficacia di questi farmaci "di ultima risorsa".

In conclusione, questo studio allerta la comunità scientifica sulla possibile diffusione di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi di origine animale grazie alla loro localizzazione plasmidica, con evidenti rischi per la salute umana. Al momento in Italia non esiste una sorveglianza per valutare la reale incidenza della resistenza a questa famiglia di antibiotici nei serbatoi animali. Un ampio *screening* in isolati resistenti al florfenicolo di origine animale consentirà di chiarire l'effettiva prevalenza di questi determinanti di resistenza anche nel nostro paese e di valutare il relativo rischio per l'uomo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Munk P, Knudsen BE, *et al.* Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microb.* 2018. 3, 898–908.
2. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011; 1241:48-70.
3. Zhanel GG, Love R, Adam H, *et al.* Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs.* 2015; 75(3):253-70.
4. Bozdogan B, Peter C. Appelbaum. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23 (2004) 113–119.
5. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy.* 2018; 12 1759–1767.
6. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat.* 2014; 17(1-2):1-12. DOI: 10.1016/j.drug.2014.04.002.
7. Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, *et al.* Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation (PDF). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, n. 6, giugno 2007, pp. 1261–4,
8. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet.* 2001; 358(9297):1975-82. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06964-1.
9. Rybak JM, Roberts K. Tedizolid phosphate: a next-Generation oxazolidinone. *Infect Dis Ther.* 2015; 4:1–14. DOI: 10.1007/s40121-015-0060-3.

10. Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, *et al.* Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol. Biol.* 1999; 294(1):93-101. DOI: 10.1006/jmbi.1999.324.
11. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(2):603-12.
12. Wilson DN, Schlunzen F, Harms JM *et al.* The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13339-44
13. Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, *et al.* Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet.* 2001; 357(9263):1179. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04376-2.
14. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 358(9277):207-8. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05410-1.
15. Kelly S, Collins J, Davin M, *et al.* Linezolid resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(4):898-9. DOI: 10.1093/jac/dkl271.
16. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, *et al.* Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(8):3554-7. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3554-3557.2005.
17. Wright A, Deane-Alder K, Marschall W, *et al.* Characterization of the Core Ribosomal Binding Region for the Oxazolidone Family of Antibiotics Using Cryo-EM. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2020, 3, 425–432.
18. Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, *et al.* Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10):3334-6. DOI: 10.1128/AAC.46.10.3334-3336.2002.

19. Long KS, Munck C, Andersen TM, *et al.* Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(11):4705-13. DOI: 10.1128/AAC.00644-10.
20. Shen T, Penewit K, Waalkes A, *et al.* Identification of a novel tedizolid resistance mutation in *rpoB* of MRSA after in vitro serial passage. *J Antimicrob Chemother.* 2021. Doi:10.1093/jac/dkaa422.
21. Billal DS, Feng J, Leprohon P, *et al.* Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics.* 2011; 12:512. DOI: 10.1186/1471-2164-12-512.
22. Shore AC, Brennan OM, Ehricht R, *et al.* Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfp* in a Pantone-Valentine Leukocidin-Positive sequence type 8 Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* IVa (USE300) isolate. *Antimicrobial Agent chemotherapy.* Dec. 2010, p. 4978–4984 doi:10.1128/AAC.01113-10.
23. Mendes RE, Deshpande M, Jihye Kim, *et al.* *Streptococcus sanguinis* isolate displaying a phenotype with cross-resistance to several rRNA-targeting agents. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug;51(8):2728-31.
24. Lee SM, Huh HJ, Song DJ, *et al.* Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible enterococci in Korea: low rate of 23S rRNA mutations in *Enterococcus faecium*. *J Med Microbiol* 2017;66:1730–1735.
25. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2530-2533.
26. Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid Pscfs1 FROM *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2004 Nov;54(5):936-9. doi: 10.1093/jac/dkh457. Epub 2004 Oct 7.

27. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L *et al.* A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 2005; 57: 1064-73.
28. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.* The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2500-5.
29. Smith LK, Mankin AS. Transcriptional and translational control of the mlr operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1703-12.
30. LaMarre JM, Locke JB, Shaw KJ, *et al.* Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(8):3714-3719. DOI: 10.1128/AAC.00153-11.
31. Toh SM, Xiong L, Arias CA, *et al.* Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol*. 2007; 64(6):1506-1514. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05744.x.
32. Shen J, Wang Y, Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob Chemother*. 2013; 68(8):1697-1706. DOI: 10.1093/jac/dkt092.
33. Wang Y, Li D, Song L, *et al.* First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8):4061-4063. DOI: 10.1128/AAC.00713-13.
34. Chen Y, Lei C, Zuo L, *et al.* A novel *cfr*-carrying Tn7 transposon derivative characterized in *Morganella morganii* of swine origin in China. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Mar 1;74(3):603-606.

35. Chen H, Deng H, Cheng L, *et al.* First report of the multi-resistance gene *cfr* in *Pasteurella multocida* strains of avian origin from China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Oct 9;S2213-7165(20)30248-4.
36. Liu Y, Wang Y, Wu Y, *et al.* First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Mar;56(3):1650-4.
37. Diaz L, Kiratisin P, Mendes RE, *et al.* Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3917-22
38. Di Sante L, Morroni G, Brenciani A, *et al.* pHT β -promoted mobilization of non-conjugative resistance plasmids from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Sep 1;72(9):2447-2453
39. Marín M, Martín A, Alcalá L, *et al.* *Clostridium difficile* isolates with high linezolid MICs harbor the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):586-9.
40. Schwarz S, Wang Y. Nomenclature and Functionality of the So-Called *cfr* Gene from *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents Chemother.* April 2015 Volume 59 2476-2477.
41. Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, *et al.* Detection of a New *cfr*-Like Gene, *cfr*(B), in *Enterococcus faecium* Isolates Recovered from Human Specimens in the United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(10):6256-61. DOI: 10.1128/AAC.01473-15.
42. Bender J, Strommenger B, Steglich M, *et al.* Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(6):1630-8. DOI: 10.1093/jac/dkv025.
43. Kuroda M, Sekizuka T, Matsui H, *et al.* Complete genome Sequence and characterization of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*

- clinical isolate KUB3006 carrying a *cfr(B)*-Transposon on its chromosome and *optrA*-plasmid. *Front Microbiol.* 2018 Oct 25;9:2576.
44. Dingle KE, Elliott B, Robinson E, *et al.* Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biol Evol* 2014. 6: 36-52.
45. Bender JK, Fleige C, Klare I, *et al.* Detection of a *cfr(B)* variant in german *Enterococcus faecium* clinical isolates and the impact on linezolid resistance in *Enterococcus spp.* *PLoS One.* 2016 Nov 28;11(11):e0167042.
46. Tang Y, Dai L, Sahin O *et al.* Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr(C)* in foodborne pathogen *Campylobacter.* *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 1581-88.
47. Liu D, Li X, Liu W, *et al.* Characterization of multiresistance gene *cfr(C)* variants in *Campylobacter* from China. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2166-2170.
48. Tang Y, Lai Y, Yang X, *et al.* Genetic environments and related transposable elements of novel *cfr(C)* variants in *Campylobacter coli* isolates of swine origin. *Veterinary Microbiology* 247 (2020) 108792.
49. Candela T, Marvaud JC, Nguyen JC, *et al.* A *cfr*-like gene *cfr(C)* conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile.* *Int J Antimicrob Agents* 50 (2017) 496–500.
50. Sassi M, Guérin F, Zouari A, *et al.* Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006-16. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Jun 1;74(6):1469-1472.
51. Pang S, Boan P, Lee T *et al.* Linezolid-resistant ST872 *Enterococcus faecium* harbouring *optrA* and *cfr(D)* oxazolidinone resistance genes. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105831.

52. Guerin F, Sassi M, Dejoies L, *et al.* Molecular and functional analysis of the novel *cfi(D)* linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Jul 1;75(7):1699-1703.
53. Stojković V, Ulate MF, Hidalgo-Villeda F *et al.* *cfi(B)*, *cfi(C)*, and a new *cfi*-like gene, *cfi(E)*, in *Clostridium difficile* strains recovered across Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 64: e01074-19.
54. Wang Yang, Lv Y, Cai J *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2182-90.
55. Sharkey LK, Edwards TA, O'Neill AJ. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio.* 2016; 7(2):e01975. DOI: 10.1128/mBio.01975-15.
56. Ero R, Kumar V, Su W, *et al.* Ribosome protection by ABC-F proteins molecular mechanism and potential drug design. *Protein Science.* 2019; DOI: 10.1002/pro.3589.
57. He T, Shen Y, Schwarz S *et al.* Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 1466-73.
58. Li D, Li XY, Schwarz S *et al.* Tn6674, A Novel Enterococcal *optrA* carrying multiresistance transposon of the Tn554 family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; DOI:10.1128/AAC.00809-19.
59. Zhou Y, Li J, Schwarz S, *et al.* Mobile oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in chicken *Clostridium perfringens*. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Jun 20;dkaa236.
60. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L *et al.* Antimicrobial Resistance in *Enterococcus spp.* of animal origin. *Microbiol. Spectrum* 2018; DOI:10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
61. Cavaco LM, Bernal JF, Zankari E, *et al.* Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). *J Antimicrob Chemother.* 2017 Mar 1;72(3):678-683.

62. Tamang MD, Dong Chan Moon, Su-Ran Kim, *et al.* Detection of novel oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* in enterococcal isolates from food animals and animal carcasses. *Veterinary Microbiology* 201 (2017) 252–256.
63. Guo D, Liu Y, Han C, *et al.* Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from pigs: implication for livestock-association markers and vaccine strategies. *Infect Drug Resist.* 2018 Aug 23;11:1299-1307.
64. Zhu Y, Zhang W, Wang W, *et al.* Identification of a novel *optrA*-harbouring transposon, Tn6823, in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Jul 29;dkaa323. In press.
65. Fan R, Dexi Li, Wang Y, *et al.* Presence of the *optrA* gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus sciuri* of porcine origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Nov 21;60(12):7200-7205.
66. Li D, Wang Y, Schwarz S, *et al.* Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jun;71(6):1474-8.
67. Fan R, Dexi Lia, Feßlerb AT *et al.* Distribution of *optrA* and *cfr* in florfenicol-resistant *Staphylococcus sciuri* of pig origin. *Veterinary Microbiology* 210 (2017) 43–48.
68. Sun C, Zhang P, Xing Ji, *et al.* Presence and molecular characteristics of oxazolidinone resistance in staphylococci from household animals in rural China. *J Antimicrob Chemother.* 2018 May 1;73(5):1194-1200
69. Wu Y, Fan R, Wang Y, *et al.* Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. *Sci Rep.* 2019 Oct 29;9(1):15500.
70. Huang J, Chen L, Wu Z, *et al.* Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of *optrA* in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Feb;72(2):614-616.

71. Mendes RE, Deshpande L, Streit JM, Sader HS, *ET AL.* ZAAPS programme results for 2016: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jul 1;73(7):1880-1887.
72. Du F, Xi Lv, Duan D, *et al.* Characterization of a linezolid- and vancomycin-resistant *Streptococcus suis* isolate that harbors *optrA* and *vanG* operons. *Front Microbiol.* 2019 Sep 10;10:2026.
73. Huang J, Sun J, Wu Y, *et al.* Identification and pathogenicity of an XDR *Streptococcus suis* isolate that harbours the phenicol-oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr*, and the bacitracin resistance locus *bcrABDR*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 54 (2019) 43–48.
74. Shang Y, Li D, Hao W, *et al.* A prophage and two ICESa2603-family integrative and conjugative elements (ICEs) carrying *optrA* in *Streptococcus suis*. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Oct;74(10):2876-2879.
75. Zhang C, Zhang P, Wang Y, *et al.* Capsular serotypes, antimicrobial susceptibility, and the presence of transferable oxazolidinone resistance genes in *Streptococcus suis* isolated from healthy pigs in China. *Vet Microbiol.* 2020 Aug;247:108750.
76. Liu D, Dawei Yang, Xiao Liu, *et al.* Detection of the enterococcal oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Campylobacter coli*. *Vet Microbiol.* 2020 Jul;246:108731.
77. Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, *et al.* Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 1118–1129. Doi:10.1093/jac/dkv438
78. Cai, J.; Schwarz, S.; Chi, D.; *et al.* Faecal carriage of *optrA*-positive enterococci in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, 25, 630.e1-630.e6.

79. Cui L, Wang Y, Lv Y, Wang S, *et al.* Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016) 60, 7490–7493.
80. Morroni G, Brenciani A, Simoni S *et al.* Commentary: Nationwide Surveillance of Novel Oxazolidinone Resistance Gene *optrA* in *Enterococcus* Isolates in China From 2004 to 2014. *Front Microbiol* 2017; 8: 1631.
81. Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM *et al.* Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 3252-57.
82. Morroni G, Brenciani A, Antonelli A *et al.* Characterization of a multiresistance plasmid carrying the *optrA* and *cfr* resistance genes from an *Enterococcus faecium* clinical isolate. *Front Microbiol* 2018; 9: 2189.
83. Egan SA, Shore AC, O'Connell B, *et al.* Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Jul 1;75(7):1704-1711.
84. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A *et al.* Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 1763-69.
85. D'Andrea MM, Antonelli A, Brenciani A, *et al.* Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying *poxtA*, *cfr* and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Oct 1;74(10):2870-2875.
86. Brenciani A, Fioriti S, Morroni G, *et al.* Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxtA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019, 74, 817-818.

87. Hao W, Shan X, Li D, *et al.* Analysis of a *poxtA*- and *optrA*-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019, 74, 1771-1775.
88. Papagiannitsis CC, Tsilipounidaki K, Malli E, *et al.* Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxtA*. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2461-2462.
89. Freitas AR, Tedim AP, Duarte B, *et al.* Linezolid-resistant (Tn6246: *fexB-poxtA*) *Enterococcus faecium* strains colonizing humans and bovines on different continents: similarity without epidemiological link. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Sep 1;75(9):2416-2423.
90. Ruiz-Ripa L, Feßler AT, Hanke D *et al.* Detection of *poxtA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 22: 28-31.
91. Lei CW, Zhuang-Zhuang K, Wu SS, *et al.* Detection of the phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxtA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of food-producing animal origin in China. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2459-2461.
92. Ruiz-Ripa L, Feßler AT, Hanke A *et al.* Mechanisms of linezolid resistance among enterococci of clinical origin in Spain-detection of *optrA*- and *cfi(D)*-carrying *E. faecalis*. *Microorganisms.* 2020 Jul 30;8(8):E1155.
93. Jung YH, Cha MH, Woo GJ, *et al.* Characterization of oxazolidinone and phenicol resistance genes in non-clinical enterococcal isolates from Korea. *Journal of antimicrobial Resistance* 24(2021)363-369.
94. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS, *et al.* Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxtA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* 2019; DOI:10.1093/jac/dkz263.
95. Kang ZZ, Lei CW, Yao TG *et al.* Whole-genome sequencing of *Enterococcus hirae* CQP3-9, a strain carrying the phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxtA* of swine origin in China. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 18: 71-73.

96. Shan X, Li XS, Wang N, *et al.* Studies on the role of IS1216E in the formation and dissemination of *poxtA*-carrying plasmids in an *Enterococcus faecium* clade A1 isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Aug 8;dkaa325..
97. Li Dexi, Cheng Y, Schwarz S, *et al.* Identification of a *poxtA*- and *cfr*-carrying multiresistant *Enterococcus hirae* strain. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Feb 1;75(2):482-484.
98. Hao W, Shan X, Li D, *et al.* Analysis of a *poxtA*- and *optrA*-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Jul 1;74(7):1771-1775.
99. Moure Z, Lara N, Marín M, *et al.* Spanish linezolid-resistant enterococci collaborating group. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus spp.* isolates carrying the *optrA* and *poxtA* genes. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 Jun;55(6):105977.
100. Mendes RE, Deshpande I, Streit JM, *et al.* ZAAPS programme results for 2016: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jul 1;73(7):1880-1887.
101. Flamm RK, Mendes RE, Hogan PA, *et al.* Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(4):2273-80. DOI: 10.1128/AAC.02803-15.
102. Bi R, Qin T, Fan W, *et al.* The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018, 13, 11–19.
103. Deshpande LM, M Castanheira, R K Flamm, *et al.* Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Sep 1;73(9):2314-2322
104. Pfaller MA, Flamm RK, Jones RN, *et al.* Activities of Tedizolid and Linezolid Determined by the Reference Broth Microdilution Method against 3,032 Gram-Positive Bacterial Isolates Collected in Asia-Pacific, Eastern Europe, and Latin

- American Countries in 2014. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(9):5393-9. DOI: 10.1128/AAC.00881-16.
105. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, *et al.* Twenty years of the SERENTRY Antifungal Surveillance Program: result for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, bonoraMarch 2019, Pages S79–S94, doi: 10.1093/ofid/ofy358.
106. Bonora MG, Ligozzi M, Luzzani A, *et al.* Emergence of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* not dependent on linezolid treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25(3):197-8. DOI: 10.1007/s10096-006-0100-8. DOI: 10.1007/s10096-006-0100-8. A
107. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, *et al.* Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3):1153-5. DOI: 10.1128/JCM.44.3.1153-1155.2006. B
108. Lambiase A, Del Pezzo M, Piazza O, *et al.* Typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in a cohort of patients in an Italian intensive care Unit. *Infection.* 2007; 35(6):428-33. DOI: 10.1007/s15010-007-6288-4.
109. Cian F, Luzzati R, Deiana ML, *et al.* Colonization of the tip of a thoracic catheter by *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and linezolid. *J Med Microbiol.* 2009; 58(Pt 8):1118-21. DOI: 10.1099/jmm.0.008334-0.
110. Fossati M, Cappelli B, Biral E, *et al.* Fatal vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* sepsis in a child undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for beta-thalassaemia major. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 7):839-42. DOI: 10.1099/jmm.0.018598-0.
111. Raponi G, Ghezzi MC, Gherardi G, *et al.* Analysis of methods commonly used for glycopeptide and oxazolidinone susceptibility testing in *Enterococcus faecium* isolates. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 6):672-8. DOI: 10.1099/jmm.0.016444-0. DOI: 10.1099/jmm.0.016444-0.

112. Fioriti S, Morroni G, Coccitto SN, *et al.* Detection of oxazolidinone resistance genes and characterization of genetic environments in enterococci of swine origin, Italy. *Microorganisms*. 2020 Dec 17;8(12):2021. Doi: 10.3390/microorganisms8122021.
113. Liu Y, Yang Wang, Stefan Schwarz, *et al.* Investigation of a multiresistance gene *cfr* that fails to mediate resistance to phenicols and oxazolidinones in *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Apr;69(4):892-8.
114. Fang LX, Duan JH, Chen MY, *et al.* Prevalence of *cfr* in *Enterococcus faecalis* strains isolated from swine farms in China: Predominated *cfr*-carrying pCPPF5-like plasmid conferring “non-linezolid resistance” phenotype. *Infect Genet Evol* 2018 Aug; 62:188-192. doi: 10.1016/j.meegid.2018.04.023.
115. Hering J, Hille K, Frömke C, *et al.* Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms—a cross-sectional study. *Prev Vet Med* 2014; 116: 129–37.
116. Antonelli A, D’Andrea MM, Galano A, *et al.* Linezolid-resistance *cfr*-positive MRSA, Italy. *J Antimicrob Chemother* 2016. DOI: 10.1093/jac/dkw108
117. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA: 2017. CLSI supplement M100.
118. Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, *et al.* Smal macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist*. 2001; 7(1):65-71. DOI: 10.1089/107662901750152828.
119. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012, 19, 455-477.
120. Seemann, T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2018; <https://github.com/tseemann/snippy>.

121. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler, A, *et al.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015, 32, 268-274.
122. Càmara, J, Camoez M, Tubau F, *et al.* Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant enterococci in Barcelona, Spain. *Microb. Drug. Resist.* 2019, 25, 87-93
123. Zhou W, Gao S, Xu H, *et al.* Distribution of the *optrA* gene in Enterococcus isolates at a tertiary care hospital in China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019, 17, 180-186.
124. Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, *et al.* Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. PMID: 24649505, Bookshelf ID: NBK190430.
125. Subbiah M, Mitchell SM, Ullman JL, *et al.* b-Lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 7255–7260. DOI: 10.1128/AEM.05352-11.