



Università Politecnica delle Marche

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche

XXXV ciclo

IDENTIFICAZIONE DI GENI DI LINEZOLID-
RESISTENZA IN ENTEROCOCCHI ISOLATI DAL
SEDIMENTO E DAL ZOOPLANCTON IN DUE
AREE COSTIERE ITALIANE

Dottoranda:

Sonia Nina Coccitto

Tutor:

Dott. Andrea Brenciani

Sommario

1. Introduzione	2
1.1. Oxazolidinoni.....	7
1.1.1. Linezolid.....	7
1.1.2. Tedizolid	9
1.1.3. Meccanismo di azione degli oxazolidinoni	11
1.2. Meccanismi di resistenza.....	14
1.2.1. Mutazioni dell'rRNA 23S.....	14
1.2.2. Mutazioni a livello delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22.....	16
1.2.3. Meccanismi di linezolid-resistenza non ribosomici	19
1.2.4. Il gene <i>cfr</i>	20
1.2.4.1. Diffusione di <i>cfr</i> nel genere <i>Staphylococcus spp.</i>	23
1.2.4.2. Diffusione del gene <i>cfr</i> nel genere <i>Enterococcus</i>	27
1.2.4.3. Diffusione del gene <i>cfr</i> in altri batteri Gram-positivi	29
1.2.4.4. Diffusione di <i>cfr</i> in batteri Gram-negativi.....	30
1.2.5. Il gene <i>cfr</i> (B)	31
1.2.6. Il gene <i>cfr</i> (C)	33
1.2.7. Il gene <i>cfr</i> (D)	36
1.2.8. Il gene <i>cfr</i> (E).....	38
1.2.9. Il gene <i>optrA</i>	39
1.2.10. Il gene <i>poxtA</i>	48
2 MATERIALI E METODI.....	54
2.1 Siti di campionamento ed isolamento di enterococchi florfenicolo-resistenti	54
2.2. Estrazione del DNA totale.....	56
2.3. Caratterizzazione genotipica	57
2.4. Antibiotici	58
2.5. Test di sensibilità	58
2.6. Smal-Pulsed Field Gel Electrophoresis e S1-PFGE	59
2.7. Intermedi circolari	61
2.8. Saggi di trasferibilità mediante coniugazione.....	61
2.9. Southern blotting ed ibridazione.....	62
2.10. Sequenziamento ed analisi di sequenza.....	64
2.11. Numeri d'accesso	65

3 RISULTATI	66
3.1. Ricerca di enterococchi florfenicolo resistenti, analisi genotipica e fenotipica	66
3.2. Tipizzazione degli isolati enterococcici	67
3.3. Localizzazione dei determinanti di resistenza agli oxazolidinoni e analisi degli intermedi circolari ...	68
3.4. Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni	72
3.5. Analisi WGS	74
4 DISCUSSIONE	80
5 BIBLIOGRAFIA	87

1. Introduzione

Il sostanziale miglioramento della salute pubblica umana in concomitanza con la scoperta degli antibiotici ha segnato una svolta decisiva nella medicina portando ad una riduzione della mortalità e morbilità nella popolazione. Tuttavia, mentre da una parte vi è il progresso nel trattamento terapeutico e nella prevenzione delle malattie infettive, dall'altra parte la comparsa della resistenza agli antibiotici rischia di rendere vano ogni tipo di miglioramento.

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (*Antimicrobial Resistance*, AMR) negli ultimi anni è aumentato considerevolmente e ha reso necessaria una valutazione dell'impatto in sanità pubblica, specifica per patogeno, per antibiotico e per area geografica. Di conseguenza, l'AMR oltre a minare i progressi verso uno sviluppo sostenibile, determina: (i) l'aumento dei costi sanitari legati alle degenze prolungate; (ii) la necessità di terapie spesso più costose e un maggior utilizzo di tecniche diagnostiche; (iii) complicanze infettive e decessi.

Generalmente l'insorgenza di una resistenza in qualsiasi comunità batterica ha un *background* naturale. Tuttavia, a causa dell'uso eccessivo, protratto ed improprio di farmaci antimicrobici in attività umane, veterinarie ed anche in agricoltura, amplifica notevolmente lo sviluppo di questa condizione di per sé spontanea. In particolar modo la presenza di antibiotici nei macro-ecosistemi quali suolo ed acqua desta

particolare preoccupazione poiché la pressione selettiva degli stessi determina, nel tempo, lo sviluppo di batteri multi-resistenti nocivi per la salute pubblica globale, sia umana che animale (Grenni *et al.*, 2017).

L'inquinamento da antibiotici dovuto all'assorbimento e/o all'accumulo di questi nelle acque sotterranee impone una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche presenti nell'ambiente tale da sviluppare una farmaco-resistenza. Espulsi principalmente attraverso feci e urine, questi batteri resistenti possono sia contaminare l'ambiente che trasmettere geni di antibiotico-resistenza, mediante *Horizontal Gene Transfer* (HGT), ad altri microrganismi presenti in differenti microhabitat o a batteri appartenenti al microbiota di animali e piante con un vantaggio in termini di fitness soprattutto in presenza di una pressione selettiva antibiotica.

Condizioni sanitarie precarie, la mancanza di un approvvigionamento idrico sicuro, l'inadeguatezza delle reti fognare, contribuiscono ad esacerbare il problema. Tra le principali cause della diffusione delle AMR giocano un ruolo rilevante: (a) l'uso inappropriato di antibiotici in clinica umana; (b) l'eccessivo impiego di antibiotici in zootecnia per promuovere un incremento ponderale e prevenire infezioni in animali sani; (c) l'insorgenza di ceppi multi-resistenti (MDR) in ambito nosocomiale che compromettono l'utilizzo di procedure mediche avanzate come trapianti, terapie immunosoppressive e impianti di materiali protesici; (d) i viaggi in Paesi a basso tenore igienico e la globalizzazione dei mercati; (e) i cambiamenti dell'ecosistema a seguito del degrado ambientale.

In particolare, le acque reflue o gli impianti di trattamento per le acque reflue possono fungere da serbatoi sia per batteri resistenti agli antibiotici (ARB) che per geni di resistenza agli antibiotici (ARG). In effetti gli impianti per il trattamento delle acque reflue costituiscono una sorta di interfaccia tra l'uomo e l'ambiente poiché le acque reflue di abitazioni e ospedali contengono non solo antibiotici ma anche

batteri di origine umana che possono costituire un pericoloso *reservoir* di ARB e ARG prima del loro rilascio nell'ambiente (Martinez *et al.*, 2009).

Diversi studi hanno anche evidenziato come l'ampio uso di antibiotici negli allevamenti animali determini un incremento della resistenza agli antimicrobici con gravi ricadute sulla salute umana (Munk *et al.*, 2018). L'aumento progressivo dell'antibiotico-resistenza e l'assenza di nuove molecole efficaci ha un impatto negativo non solo sull'economia dei settori zootecnici e sull'industria alimentare, ma può condurre ad una situazione particolarmente preoccupante per gli allevatori visto la loro potenziale esposizione ad animali portatori di batteri multiresistenti. Inoltre, numerosi studi evidenziano come 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 potrebbe rappresentare un veicolo di trasmissione dagli animali all'uomo.

Pertanto, i batteri antibiotico-resistenti rappresentano una grave minaccia per la salute pubblica in quanto capaci di diffondere da uomo a uomo, negli animali, negli alimenti e nell'ambiente e quindi devono essere attentamente monitorati.

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

L'approccio *One Health* (Figura 1) viene inteso come una stretta connessione tra la salute dell'uomo e quella degli animali e dell'ambiente. Nel 2008 il sistema *One Health* diventa a tutti gli effetti un approccio raccomandato al fine di conseguire condizioni ottimali di salute per la popolazione umana, animale e per l'ambiente.

Nel 2015 in occasione dell'Assemblea Mondiale della Sanità, il WHO ha approvato un piano d'azione specifico per il controllo delle AMR basato su diverse strategie:

- (a) una migliore consapevolezza e comprensione della resistenza antimicrobica;
- (b) un rafforzamento della sorveglianza e un potenziamento della ricerca;
- (c) una maggiore osservanza delle condizioni igieniche sanitarie;
- (d) un impiego più razionale dei farmaci antimicrobici;
- (e) un piano di investimenti sostenibili nella lotta alla resistenza antimicrobica.

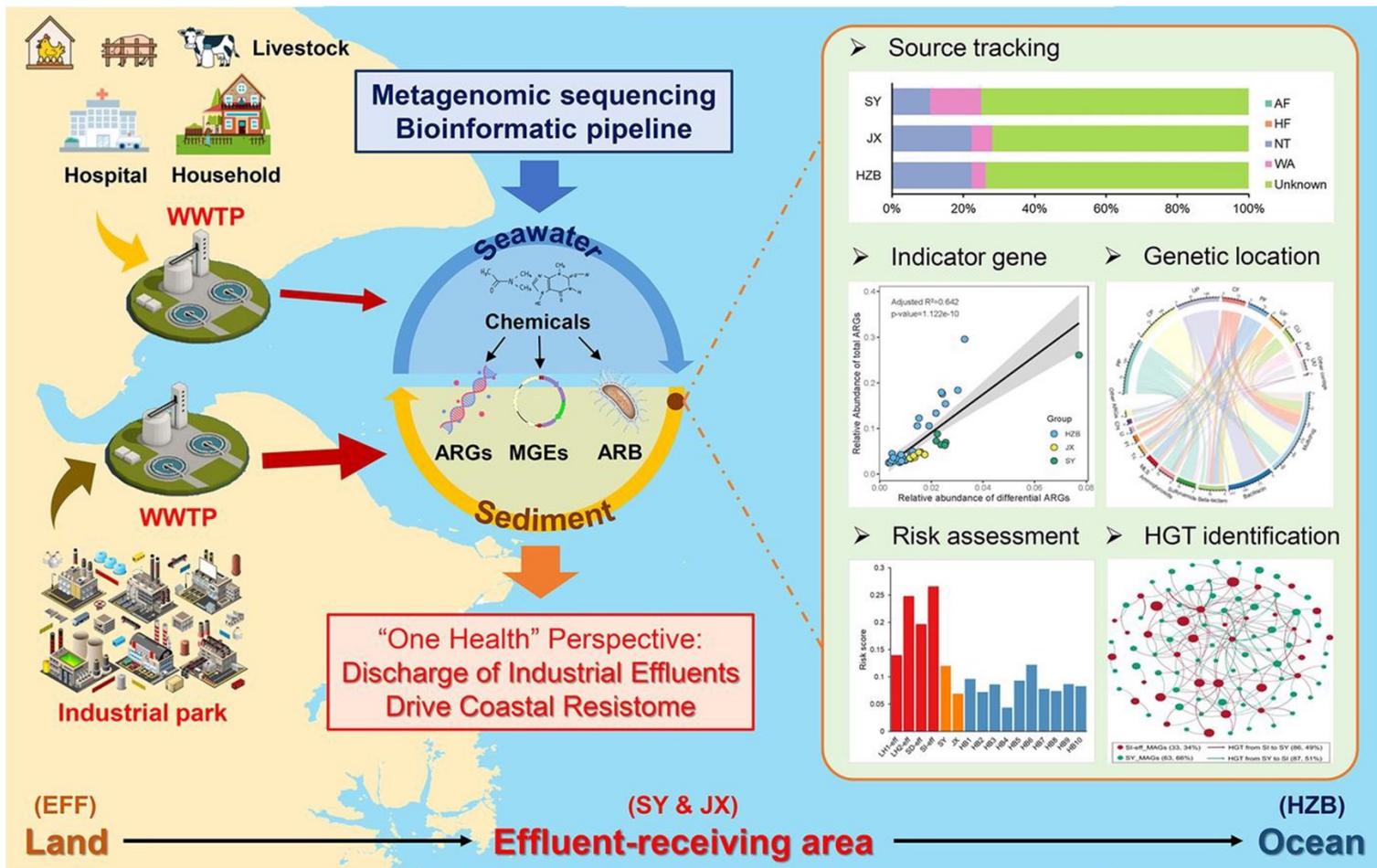


Figura 1. Approccio *One Health*.

Gli enterococchi, batteri Gram-positivi, sono comuni commensali del tratto intestinale di mammiferi e uccelli, ma possono essere isolati anche da varie altre fonti, tra cui suolo, piante, alimenti ed ecosistemi acquatici. Nell'intestino umano, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* sono le specie più comuni e anche più spesso responsabili di infezione. Benché, altre specie, come *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus gallinarum* possono essere coinvolte.

Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti a una vasta gamma di agenti antimicrobici, tra cui sulfamidici e basse concentrazioni di amminoglicosidi e hanno anche una ridotta sensibilità a molti β -lattamici. La capacità degli enterococchi di sopravvivere in numerosi habitat naturali e di adattarsi alle diverse condizioni ambientali fanno di questo genere batterico un *central-hub* nella diffusione di geni di resistenza tra batteri Gram-positivi (Werner *et al.*, 2013).

E. faecalis ed *E. faecium*, sono riconosciuti ormai da anni come importanti patogeni opportunisti soprattutto in ambito nosocomiale dove si rendono responsabili di gravi infezioni quali batteriemie, endocarditi, infezioni del tratto urinario e di ferite post-chirurgiche. Queste due specie enterococciche mostrano un elevato potenziale di patogenicità riconducibile alla loro particolare propensione ad acquisire molteplici determinanti di resistenza mediante HGT. Numerosi studi hanno ulteriormente evidenziato la diffusione di cloni ad alto rischio, in particolare ceppi vancomicina-resistenti (VRE) all'interno e tra diverse strutture sanitarie (Arias *et al.*, 2012).

Un report del 2018 redatto dalla Rete di Sorveglianza Europea della Resistenza Antimicrobica, EARS-Net, registra un incremento della percentuale media per la popolazione EU/EEA (European Union/ European Economic Area) dal 10,5% nel 2015 al 17,3% per infezioni sostenute da VRE.

La crescente comparsa di resistenze acquisite verso vari antibiotici limita perciò significativamente le opzioni terapeutiche in ambito clinico e rappresenta una grave minaccia per il trattamento di gravi infezioni enterococciche (Bender *et al.*, 2018).

Gli oxazolidinoni, una nuova famiglia di antibiotici sintetici approvata e commercializzata all'inizio del nuovo millennio, sono tra i pochi antibiotici di ultima istanza disponibili per il trattamento di gravi infezioni causate da batteri Gram-positivi multiresistenti, quali *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), VRE, pneumococchi e micobatteri multiresistenti (MDR).

Purtroppo, sempre più casi di patogeni resistenti agli oxazolidinoni, vengono segnalati in tutto il mondo; pertanto, il loro impegno come farmaci *last resort* rende

indispensabile un continuo monitoraggio delle resistenze e un utilizzo razionale di questi antibiotici al fine di preservarne l'efficacia terapeutica.

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 oxazolidinico. La prima descrizione di questa classe di antibiotici avvenne nel 1987, quando i ricercatori della E.I. DuPont de Nemours & Company pubblicarono uno studio sull'attività antimicrobica *in vitro* e *in vivo* di questa nuova classe di farmaci spinti dalla necessità di ricercare nuove molecole antimicrobiche in grado di contrastare la crescente antibiotico-resistenza, soprattutto nei Gram-positivi. 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 oxazolidinoni non tossici: eperezolid e linezolid (Shaw *et al.*, 2011). Entrambe le molecole, in fase preclinica, mostravano caratteristiche essenzialmente sovrapponibili in termini di solubilità, potere antimicrobico, spettro d'azione ed efficacia nei modelli murini tuttavia, solo il linezolid, grazie ad una farmacocinetica più favorevole, fu selezionato per la fase clinica II; dopo diversi *trials* nel 2000 la *Food and Drug Administration* (FDA) approvò il linezolid per uso clinico.

Qualche anno dopo venne sviluppato un oxazolidinone di seconda generazione, il tedizolid, approvato dalla FDA nel giugno 2014 per il trattamento di gravi infezioni batteriche della pelle e tessuti molli (Zhanel *et al.*, 2015).

1.1.1. Linezolid

Il linezolid, nome commerciale di Zyvox[®] e primo oxazolidinone ad esser stato approvato in ambito clinico, è un antibiotico sintetico ad azione batteriostatica utilizzato in clinica come *last-resort* per il trattamento di infezioni gravi sostenute da batteri Gram-positivi multi-resistenti quali: infezioni complicate della pelle e polmoniti nosocomiali causate da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), batteriemie associate a enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) e polmoniti comunitarie determinate da pneumococchi MDR (Bozdogan *et al.*, 2004). Strutturalmente, il linezolid è un composto eterociclico di cui il gruppo N-ariloxazolidinone è essenziale per l'attività del farmaco, come è indispensabile la configurazione sterica del C-5 e il gruppo C-5 acil-amino- metilico dell'anello A. Il sostituente fluoro-aromatico e il gruppo morfolinico in posizione para, sono responsabili rispettivamente di una maggiore disponibilità del farmaco e della farmacocinetica più favorevole; entrambi i sostituenti contribuiscono ad incrementare la idrosolubilità e ridurre gli effetti tossici (Hashemian *et al.*; 2018) (Figura 2).

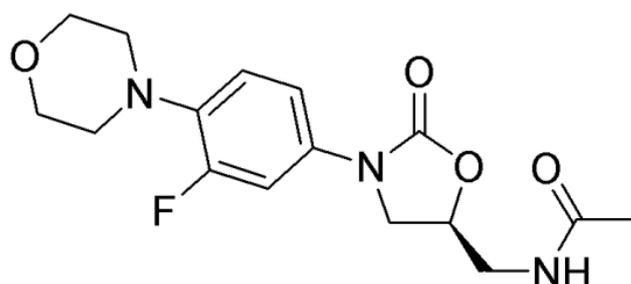


Figura 2. Struttura chimica del linezolid

Gli studi sull'attività antimicrobica del linezolid hanno evidenziato come tale farmaco risulti essere particolarmente attivo nei confronti dei Gram-positivi ma poco efficace verso i Gram-negativi. Di fatti, la valutazione *in vitro* della sua attività indica valori di minima concentrazione inibente 50 (MIC₅₀) di 2-4 mg/L sia negli

enterococchi che negli stafilococchi (Mendes *et al.*, 2014). L'utilizzo del linezolid in clinica prevede una somministrazione per via orale o per via parenterale ed in entrambi i casi la dose consigliata è pari a 600 mg ogni 12 ore (Diekema *et al.*, 2001). Alcuni studi hanno evidenziato che un uso prolungato dell'antibiotico può portare alla comparsa di effetti collaterali la cui gravità ed entità dipende dalla durata temporale della sua assunzione; ad esempio, possono insorgere trombocitopenia e anemia dopo 4-6 settimane o neuropatie in pazienti che hanno assunto il linezolid per più di 6 mesi (Bozdogan *et al.*, 2004).

1.1.2. Tedizolid

Le limitazioni legate agli effetti collaterali indotti dall'uso prolungato del linezolid e la comparsa di ceppi linezolid-resistenti hanno accelerato la sintesi di nuovi oxazolidinoni in grado di superare queste problematiche. Il tedizolid commercializzato con il nome Sivextro[®], precedentemente noto come Torezolid, è il primo oxazolidinone di seconda generazione in grado di inibire la crescita di batteri che hanno sviluppato resistenza al linezolid. Da un punto di vista chimico, il tedizolid si differenzia dal linezolid per: (i) l'aggiunta di un anello D che induce maggiore stabilità di legame al sito bersaglio; (ii) un gruppo metilico nel C₅ dell'anello A al posto del gruppo acil-amino-metilico (Rybak *et al.*, 2015) (Figura 3).

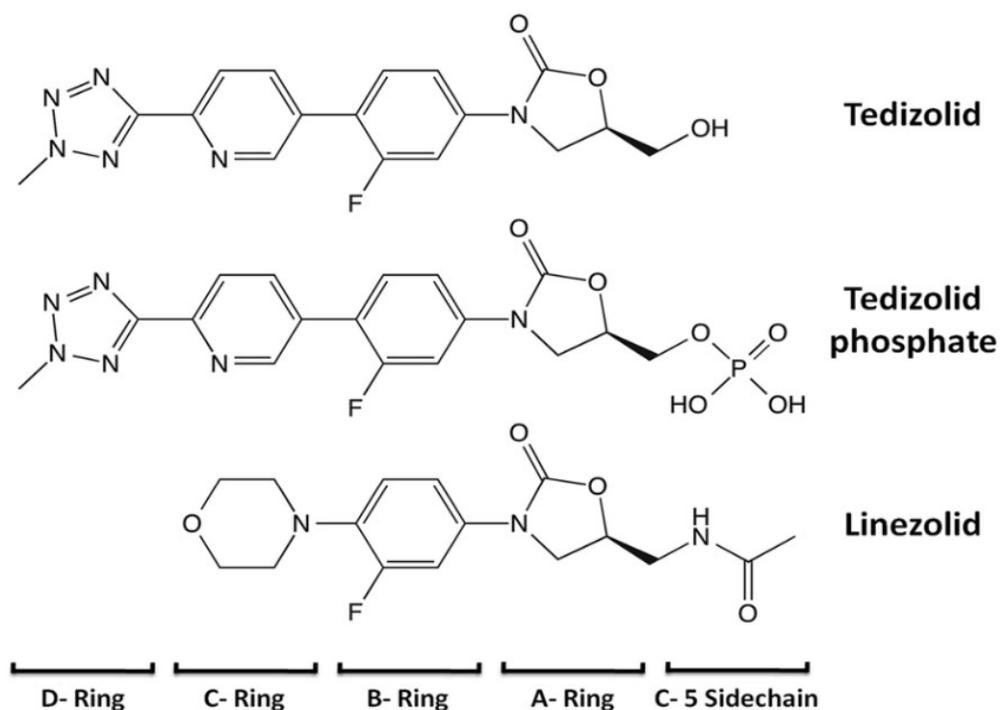


Figura 3. Struttura chimica del linezolid e tedizolid a confronto.

Inoltre, il tedizolid, rispetto al linezolid possiede un'emivita maggiore il che ne permette una somministrazione giornaliera, orale o parenterale, a dosi più basse (200 mg/die), ma soprattutto sembra avere una minore influenza sui parametri ematologici (trombocitopenia e anemia come precedentemente osservato per somministrazioni prolungate di linezolid). Il tedizolid viene assunto sotto forma di profarmaco fosforilato; difatti il gruppo fosfato aumenta la sua solubilità in acqua e la biodisponibilità. 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 *in vitro* evidenziano che il tedizolid è più attivo 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 nel complesso fanno del tedizolid un'ottima opzione terapeutica nel trattamento di infezioni gravi sostenute da batteri Gram-positivi multiresistenti.

1.1.3. Meccanismo di azione degli oxazolidinoni

Gli oxazolidinoni esercitano la loro attività antimicrobica inibendo la sintesi proteica batterica. Il primo studio sul loro meccanismo d'azione, in particolare sul linezolid, fu pubblicato nel 1999 da Kloss *et al.* che identificarono come target del farmaco il centro della peptidiltrasferasi (PTC) della subunità 50S dei ribosomi batterici (Kloss *et al.*, 1999). Per chiarire definitivamente il *target* del linezolid, decisivi furono gli studi cristallografici condotti sul complesso linezolid/subunità ribosomiale 50S di *Haloarcula marismortui* – organismo appartenente al dominio degli *Archea* avente una singola copia dell'rDNA 23S che permette di superare il problema della ridondanza degli operoni per gli RNA ribosomiali – e della specie batterica *Deinococcus radiodurans* (Long *et al.*, 2012). La risoluzione delle strutture cristallografiche ha rivelato che il linezolid agiva interagendo con l'rRNA 23S legandosi al sito A nel PTC inducendo il blocco delle fasi iniziali della traduzione (Figura 4).

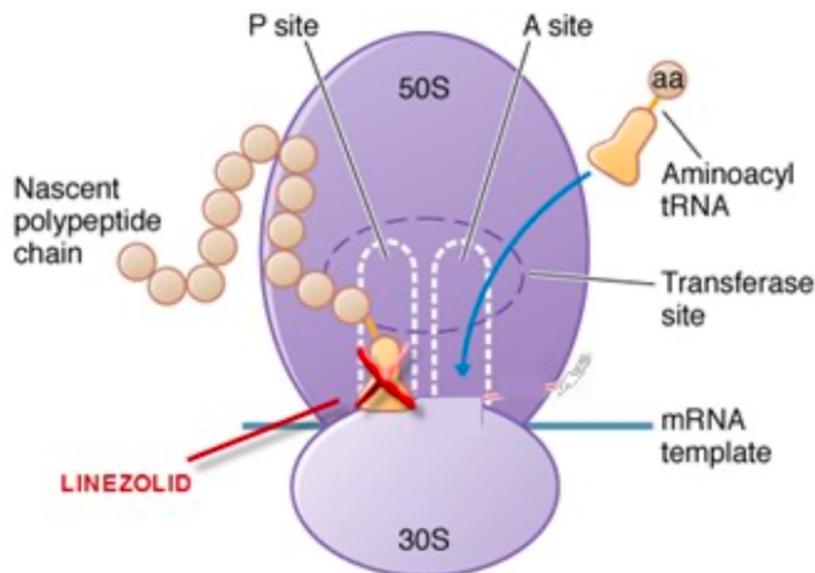


Figura 4. Interazione del linezolid con il ribosoma batterico.

Lo stesso studio ha inoltre evidenziato che il legame del linezolid alla subunità 50S del ribosoma batterico induceva dei cambiamenti nella posizione di alcuni nucleotidi conservati, come ad esempio l'U2585, indispensabili per il corretto posizionamento del tRNA nel sito P (Figura 5).

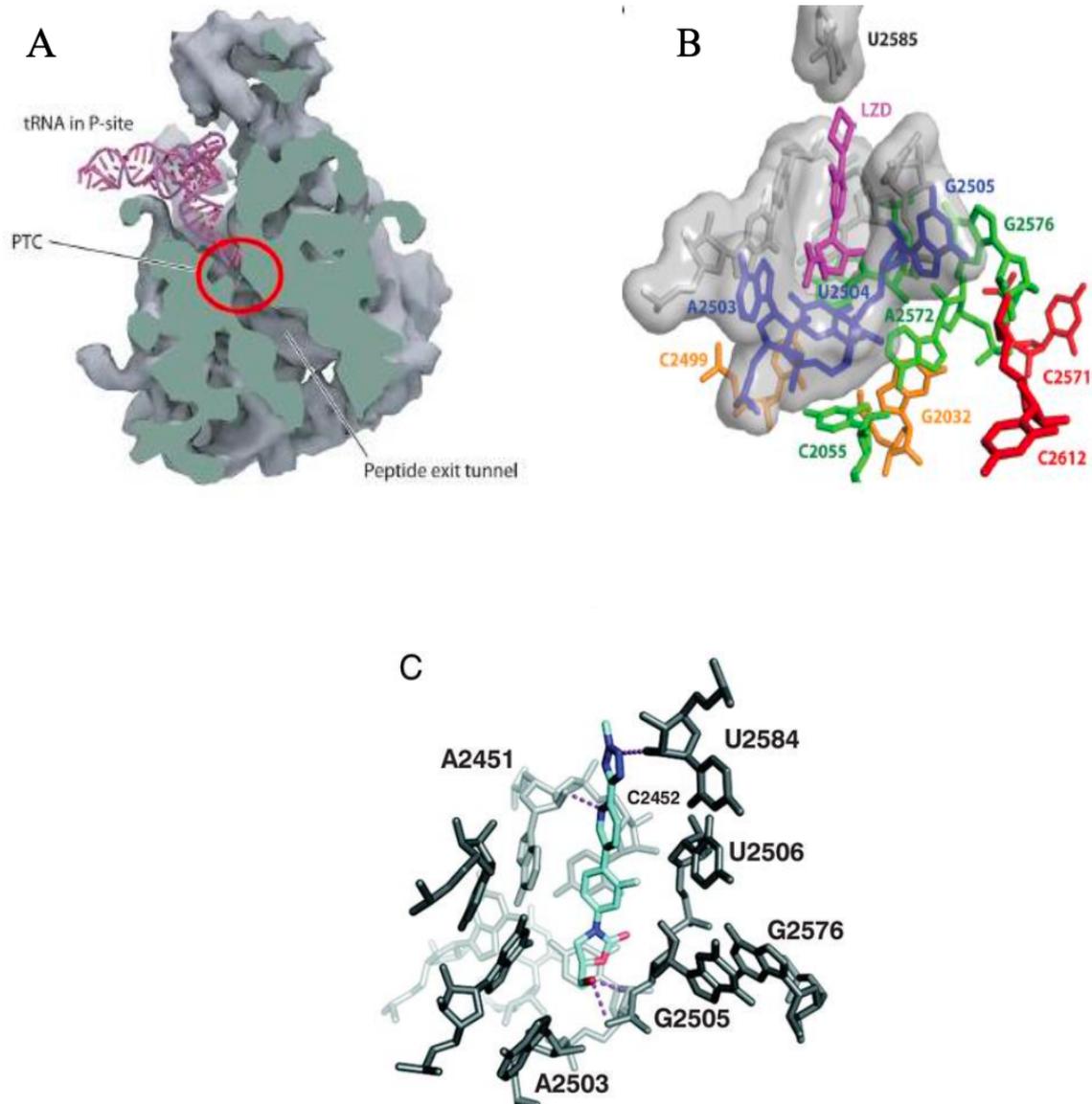


Figura 5: A) Sezione sagittale della subunità 50S del ribosoma in cui è visibile il legame del tRNA (in viola) legato al sito P; la PTC è identificata del cerchio rosso. Tratto da Long *et al.*, 2012.

B) 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.

C) Sito di legame del Tedizolid nel PTC. I legami idrogeno fondamentali sono indicati da linee tratteggiate viola. Tratto da Shaw *et al.*, 2008.

È interessante notare che lo stesso sito viene parzialmente legato anche da altre classi di antibiotici (cloramfenicolo, streptogramine A, lincosamidi) e dunque sono comuni i casi di cross-resistenza tra linezolid ed altri farmaci che agiscono a livello del PTC, anche se i meccanismi di azione e l'affinità per il sito non sono propriamente identici.

Successivamente, Wilson e collaboratori fornirono un ulteriore modello di azione degli oxazolidinoni che prevedeva 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 6) (Wilson *et al.*, 2008).

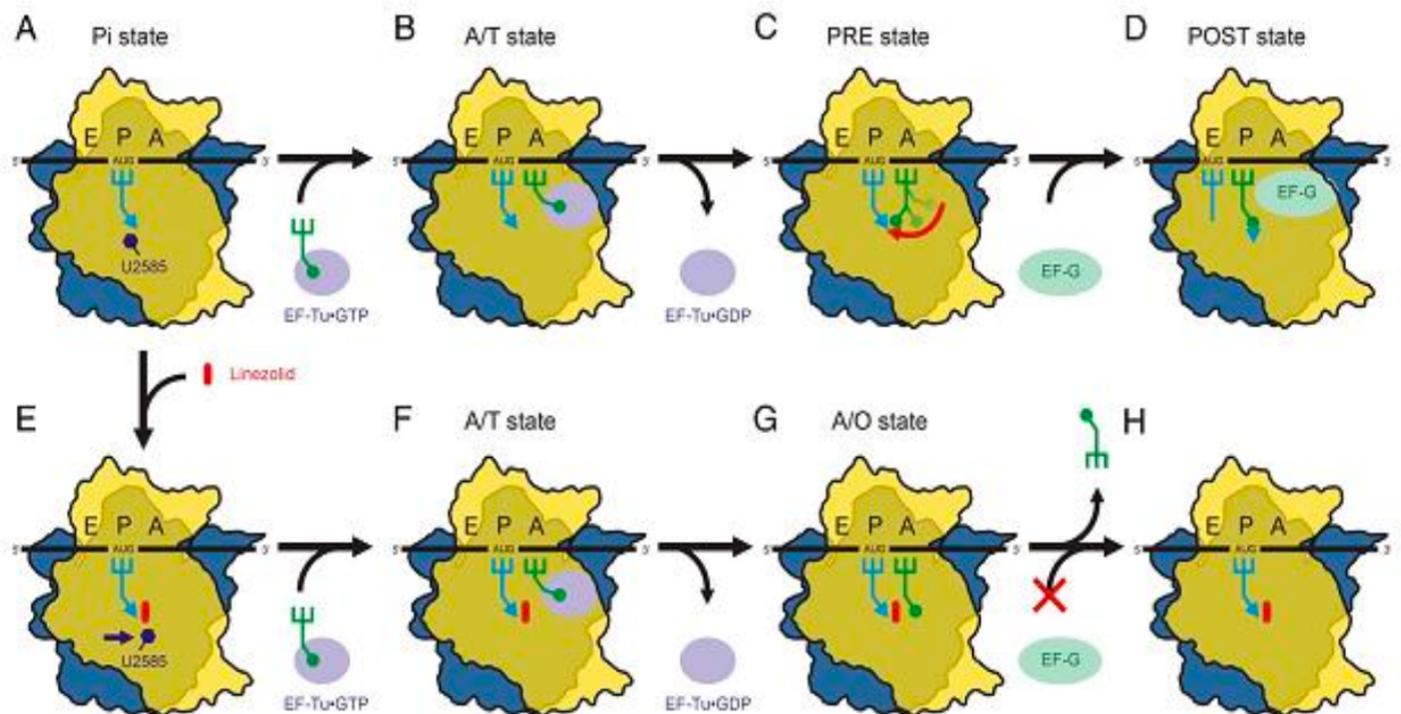


Figura 6. Attività inibitoria degli oxazolidinoni durante la traduzione. (A-D) eventi durante la normale traduzione (E-H) eventi in presenza di oxazolidinoni (rosso).

Il sito di legame per il tedizolid nel PTC è simile a quello per il linezolid, sebbene la presenza dell'anello D nella struttura chimica del tedizolid potrebbe coinvolgere dei siti di legame aggiuntivi nel ribosoma batterico; probabilmente questa condizione è responsabile della migliore attività del tedizolid rispetto al linezolid (Brenciani *et al.*, 2022).

1.2. Meccanismi di resistenza

La natura sintetica degli oxazolidinoni aveva indotto a pensare che la comparsa dei primi ceppi resistenti a questa classe di antibiotici, si sarebbe verificata solo dopo un periodo ragionevolmente lungo di utilizzo in clinica. Contrariamente alle aspettative, le prime resistenze iniziano ad apparire un anno dopo la comparsa del linezolid sul mercato. Tale 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* (Volter *et al.*, 2005).

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

1.2.1. Mutazioni dell'rRNA 23S

Il sito di legame del linezolid a livello del PTC, presente nel dominio V dell'rRNA 23S della subunità 50S del ribosoma procariotico, consiste di alcuni nucleotidi altamente conservati come G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 e U2585 (numerazione riferita ad *Escherichia coli*) che interagiscono direttamente con 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) sia nucleotidi più lontani dal sito di interazione (A2062, G2447, A2453 e G2576) (Figura 7).

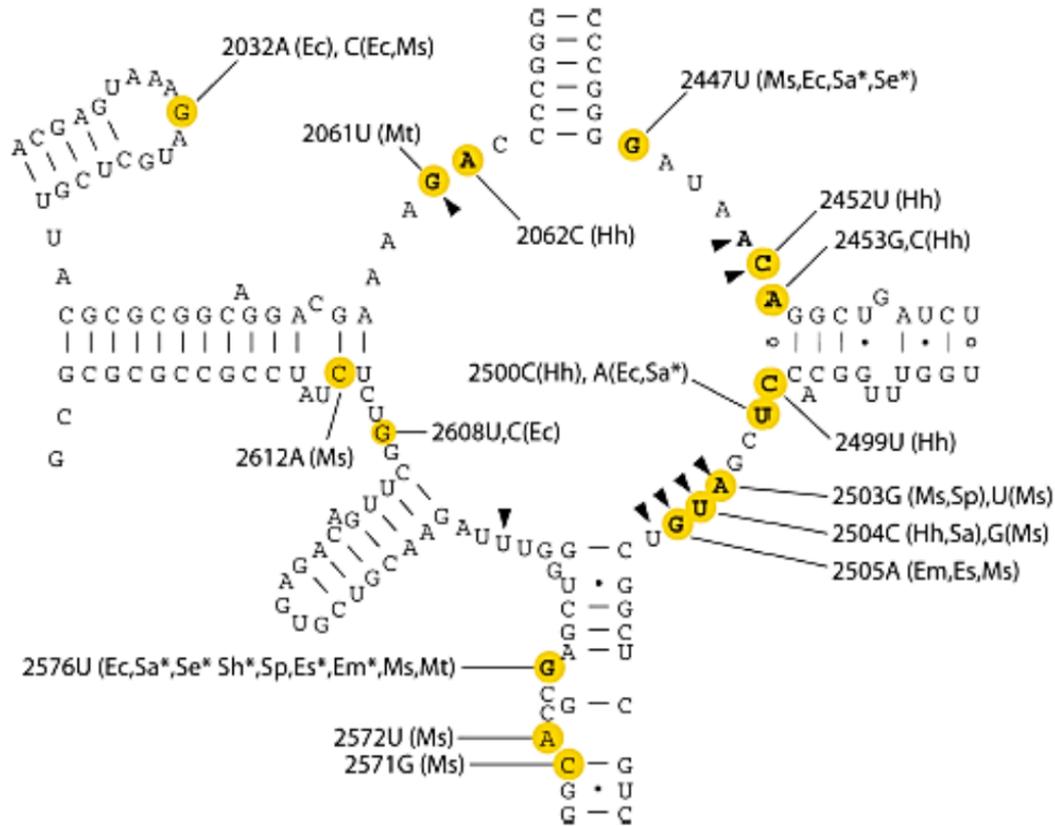


Figura 7. Struttura secondaria del loop del dominio V dell'rRNA 23S (sequenza nucleotidica riferita a *Mycobacterium smegmatis*, numerazione riferita a *E. coli*). I triangoli neri indicano i nucleotidi che interagiscono direttamente con il linezolid. Evidenziati da cerchi gialli sono riportati i nucleotidi che vanno incontro a mutazioni; quelli in grassetto rappresentano mutazioni che conferiscono 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 a isolamento clinico.

Diversi studi hanno mostrato che la mutazione G2576U risulta essere maggiormente diffusa tra gli stafilococchi ed enterococchi (Long *et al.*, 2012) probabilmente a causa di un prolungato trattamento o di un sovradosaggio del farmaco.

Inoltre, la maggior parte dei batteri possiede geni codificanti per gli rRNA organizzati in copie multiple di operoni: in *S. aureus* da 5 a 7 operoni, *E. faecalis* più comunemente 4 operoni e in *E. faecium* fino a più di 7 operoni. Diversi studi suggeriscono una correlazione tra la presenza di un numero elevato di copie di alleli mutanti di G2576U ed elevati valori di MIC di linezolid in ceppi clinici di *S. aureus*, *E. faecalis* ed *E. faecium* (Long *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2002; Brenciani *et al.*, 2022). In realtà, la frequenza di mutazioni multiple in grado di conferire livelli più elevati di resistenza, è molto bassa poiché associata ad un elevato costo di fitness per il batterio. Solitamente, un incremento nel numero di copie di alleli mutati di G2576U si verifica in ceppi isolati da pazienti sottoposti a lunghi cicli di terapia con linezolid (Bolmstrom *et al.* 2002), sottolineando l'importanza di un impiego razionale di linezolid in ambito clinico.

È stato inoltre osservato che, la delezione di una copia di 23S rDNA (*rrl*) può contribuire allo sviluppo della resistenza al linezolid in *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus warneri* (Brenciani *et al.*, 2022).

1.2.2. Mutazioni a livello delle proteine ribosomiali L3, L4 e L22

Un altro meccanismo di resistenza al linezolid coinvolge la comparsa di mutazioni a livello dei geni *rpIC*, *rpID* e *rpIV* codificanti rispettivamente per le proteine ribosomiali L3, L4 e L22. In particolare, una regione della proteina ribosomiale L3 si posiziona sulla superficie della subunità 50S protraendosi attraverso una struttura a loop all'interno del PTC; anche parte della proteina L4 si localizza in prossimità del PTC ma nel tunnel attraverso il quale i peptidi nascenti escono dal ribosoma (Long *et al.*, 2012). Quindi, sebbene queste proteine non facciano parte direttamente del PTC, le mutazioni che coinvolgono geni corrispondenti e che provocano cambiamenti negli aminoacidi vicini al PTC probabilmente influiscono sulla loro conformazione e stabilità (Brenciani *et al.*, 2022) (Figura 8).

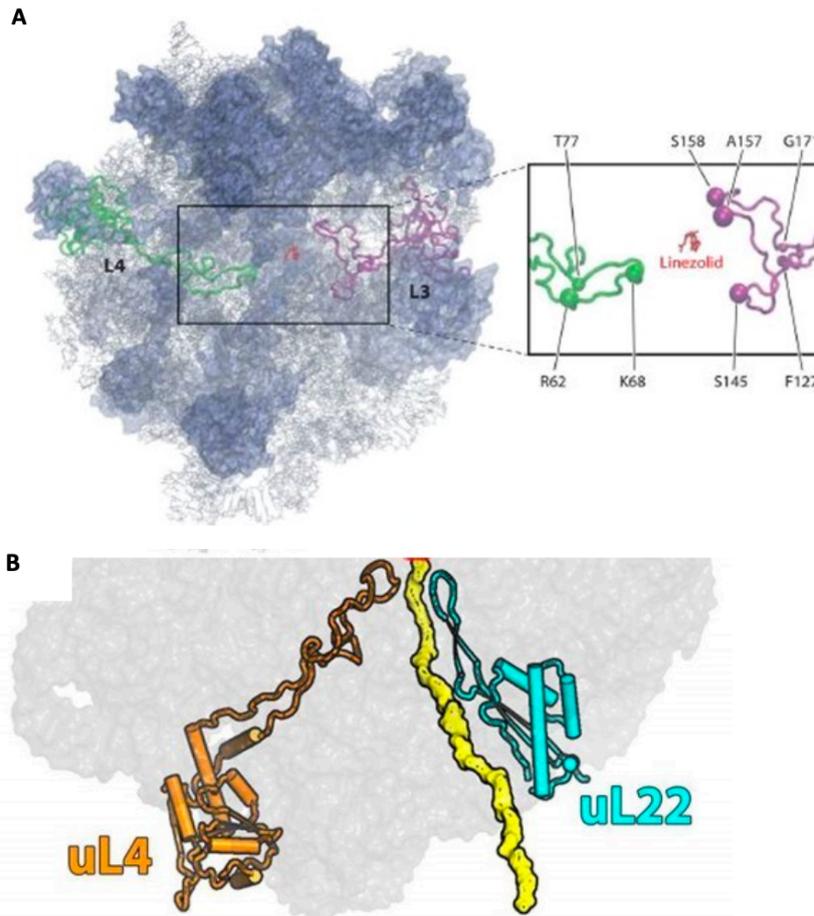


Figura 8: A) Rappresentazione delle proteine ribosomiali L3 (in viola) e L4 (in verde) in corrispondenza del PTC sito di legame del linezolid (in rosso).

B) Rappresentazione della proteina ribosomiale L22 (in azzurro) all'interno del complesso ribosomiale. arancione la proteina L4 e in giallo la catena polipeptidica nascente.

Sostituzioni amminoacidiche a carico delle proteine L3 e L4 in grado di causare una ridotta sensibilità al linezolid, sono state riportate in numerosi isolati, sia da sole che in associazione con altri meccanismi di resistenza (Brenciani *et al.*, 2022). In Tabella 1 sono riassunte le principali alterazioni amminoacidiche delle proteine ribosomiali che mediano la resistenza al linezolid.

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

Mutazione	Organismo	<i>D. radiodurans</i> L3 ^a	LZD distanza ^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, <i>cfr</i>
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, <i>cfr</i> , L3-L101V
S158Y/D159Y	<i>S. cohnii</i>	K145/T146	13.3/5.4	C, <i>cfr</i> , L4-N20S/A133T/V155I
ΔM169-G174	<i>S. aureus</i>	DM156-G161		C, <i>cfr</i>
L4				
N20S/A133T/V155I	<i>S. cohnii</i>	— ^f		C, <i>cfr</i> , 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

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

^bDistanza tra linezolid e i corrispondenti aminoacidi di *D. radiodurans*.

^cInformazioni 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.

^fNessun dato sugli allineamenti è disponibile

Successivi studi hanno inoltre dimostrato che la maggior parte delle mutazioni erano localizzate nella proteina L3, probabilmente a causa della sua vicinanza al PTC e

quelle più diffuse, associate alla resistenza al linezolid, erano F147L e/o A157R (Tabella 1). Inoltre, è emerso che le mutazioni in L3 potrebbero avere un effetto compensatorio in termini di fitness in isolati che presentano mutazione G2576U nell'rRNA 23S (Brenciani *et al.*, 2022).

Per quanto concerne la proteina ribosomiale L4, le alterazioni sono sempre state riscontrate in concomitanza con altre mutazioni in L3 o in associazione ad altri meccanismi di resistenza, come si evince dalla Tabella 1. Tuttavia, diversi studi hanno evidenziato come la regione della proteina L4 vicina al PTC sia soggetta a un tasso di inserzioni e delezioni maggiore, il che si traduce in resistenza al linezolid; Wolter *et al.*, hanno dimostrato che le delezioni 65WR66 e 68KG69 (Tabella 1) nella proteina L4 erano responsabili di un incremento 4 volte maggiore del valore di MIC del linezolid in due ceppi di *Streptococcus pneumoniae* (Wolter *et al.*, 2005; Brenciani *et al.*, 2022). Anche la sostituzione amminoacidica K86Q trovata in *Staphylococcus aureus*, sembra giocare un ruolo nella linezolid resistenza (Brenciani *et al.*, 2022).

Sono state rilevate mutazioni anche nel gene *rplV* che codifica per la riboproteina L22 tra cui, A29V, N56D e S77T (Shore *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2017). Nonostante si sappia ancora ben poco sugli effetti di queste mutazioni e delle conseguenti sostituzioni nella resistenza agli oxazolidinoni, si presume che giochino un ruolo determinante sul fenotipo di resistenza a causa della loro stretta vicinanza al sito di legame del linezolid (Long *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013).

1.2.3. Meccanismi di linezolid-resistenza non ribosomici

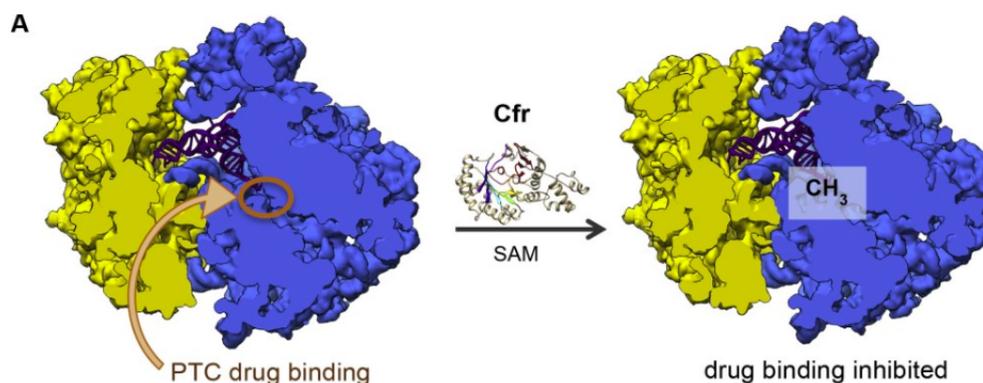
In *S. pneumoniae* è stato individuato un meccanismo di linezolid-resistenza correlato a mutazioni che over esprimono geni che codificano per i trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*) in grado di estrarre il linezolid al di fuori della cellula batterica (Billal *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2009).

Molto recentemente, uno studio ha evidenziato la prima mutazione non ribosomica indotta *in vitro* dopo diversi passaggi seriali, in grado di determinare resistenza agli oxazolidinoni (sia linezolid che tedizolid) in un ceppo di *S. aureus* meticillino-resistente. L'alterazione nucleotidica è stata evidenziata nel gene *rpoB* (A1345G, corrispondente alla sostituzione amminoacidica D449N della proteina RpoB) che codifica per la subunità β della RNA polimerasi batterica. Tale mutazione è in grado di conferire non solo la resistenza agli oxazolidinoni, ma anche ai fenicoli, retapamulina e quinupristin/dalfopristin (Shen *et al.*, 2021).

1.2.4. Il gene *cfr*

Il gene *cfr* (*chloramphenicol and florfenicol resistance*), identificato nel 2001 in un isolato bovino di *Staphylococcus sciuri* in Germania, è stato il primo determinante di resistenza trasferibile in grado di conferire resistenza al linezolid (Schwarz *et al.*, 2000).

Kehremberg e collaboratori hanno dimostrato in dettaglio l'azione del gene *cfr* che codifica una rRNA metiltrasferasi in grado di aggiungere un gruppo metile al C₈ dell'adenina in posizione 2503 dell'rRNA 23S (Figura 9) (Kehremberg *et al.*, 2004).



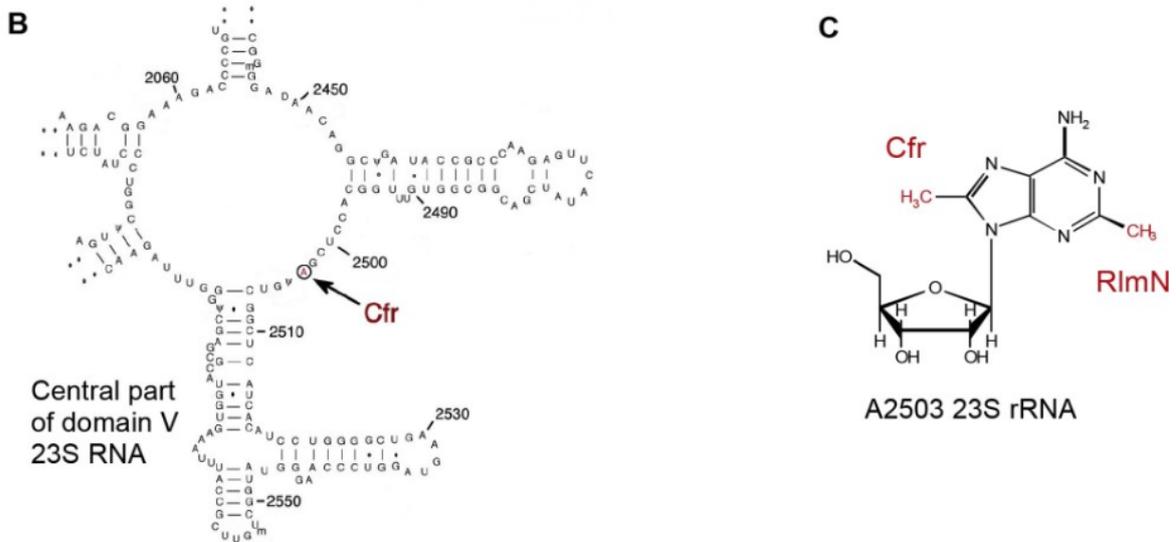


Figura 9. Sito di metilazione nel ribosoma da parte di Cfr.

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 A2503 conferisce una cross-resistenza a cinque differenti classi antimicrobiche 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 chiamato PhLOPS_A (Long *et al.*, 2006). Tuttavia, la metilazione mediata da *cfr* non conferisce resistenza al tedizolid in quanto il nucleotide A2503 non è direttamente coinvolto con il legame di questo antibiotico al PTC a causa dei sostituenti del C₅ dell'anello A (Figura 10) (Brenciani *et al.*, 2022).

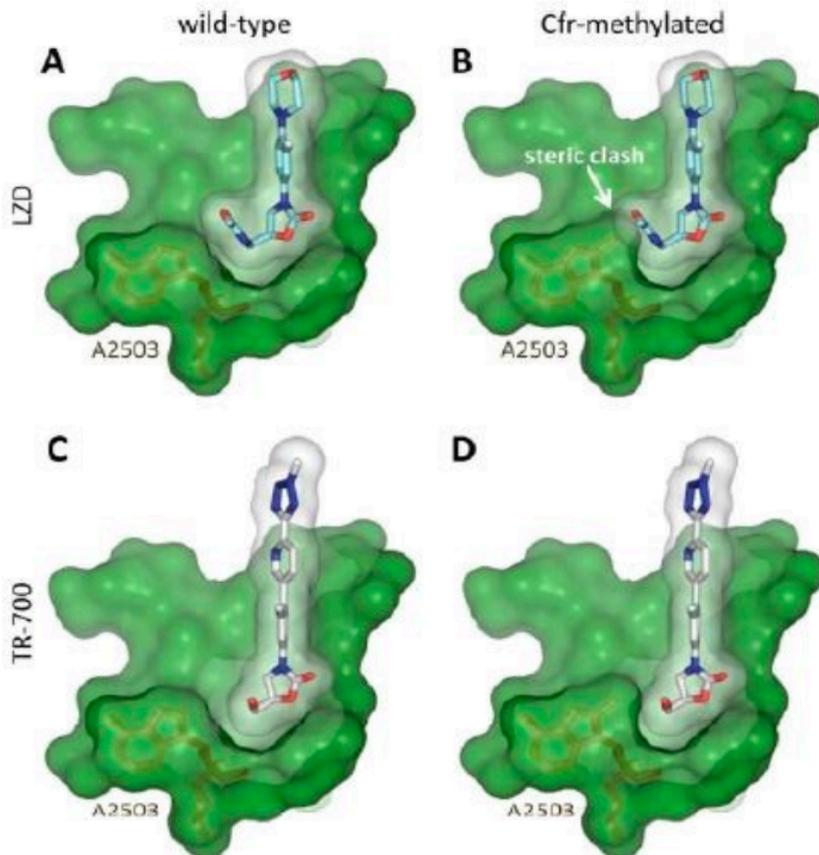


Figura 10. Analisi cristallografica delle strutture ribosoma/oxazolidinone in presenza della metilazione indotta da *cfr*.

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.

Successivamente, Smith e colleghi hanno mostrato che la proteina Cfr *determinava* un incremento significativo dei valori di MIC di alcuni macrolidi con anelli a 16 atomi di carbonio come la spiramicina e la josamicina (Smith *et al.*, 2008).

Dalla sua scoperta ad oggi, il gene *cfr* è stato identificato in sei generi Gram-positivi (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Jeotgalicoccus* e *Streptococcus*) e in sette generi Gram-negativi (*Proteus*, *Escherichia*, *Morganella*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Vibrio* e *Leclercia*) (Brenciani *et al.*, 2022). Il motivo di questa ampia diffusione sembra essere dovuto alla localizzazione del determinante su elementi genetici mobili (MGE), tipicamente plasmidi coniugativi che costituiscono un importante veicolo per la sua diffusione intra- ed inter-specie. Inoltre, la diffusione di *cfr* potrebbe essere promossa anche da altri fattori quali: (i)

la presenza di *Insertion Sequence* (IS) fiancheggianti il gene che determinano la mobilità e l'integrazione in diversi contesti genetici; (ii) il basso costo di fitness associato alla sua acquisizione; (iii) la co-selezione e il mantenimento in assenza di una pressione selettiva diretta dovuta ad altri geni di resistenza antimicrobica localizzati sugli stessi elementi genetici mobili (Brenciani *et al.*, 2022).

Nonostante la localizzazione più frequente del gene *cfr* sia quella plasmidica, sono state anche descritte localizzazioni cromosomiche del determinante di resistenza (Schwarz *et al.*, 2021, Brennciani *et al.*, 2022).

Ad oggi, il gene *cfr* è stato riportato in 25 paesi di cinque continenti diversi (Figura 11). Tutti i batteri *cfr*-positivi originano da fonti differenti: umani, bovini, maiali, cavalli, cani, gatti, polli, tacchini, anatre od oche, ma anche da carne di pollo, manzo e maiale, nonché da campioni ambientali (Schwarz *et al.*, 2021).

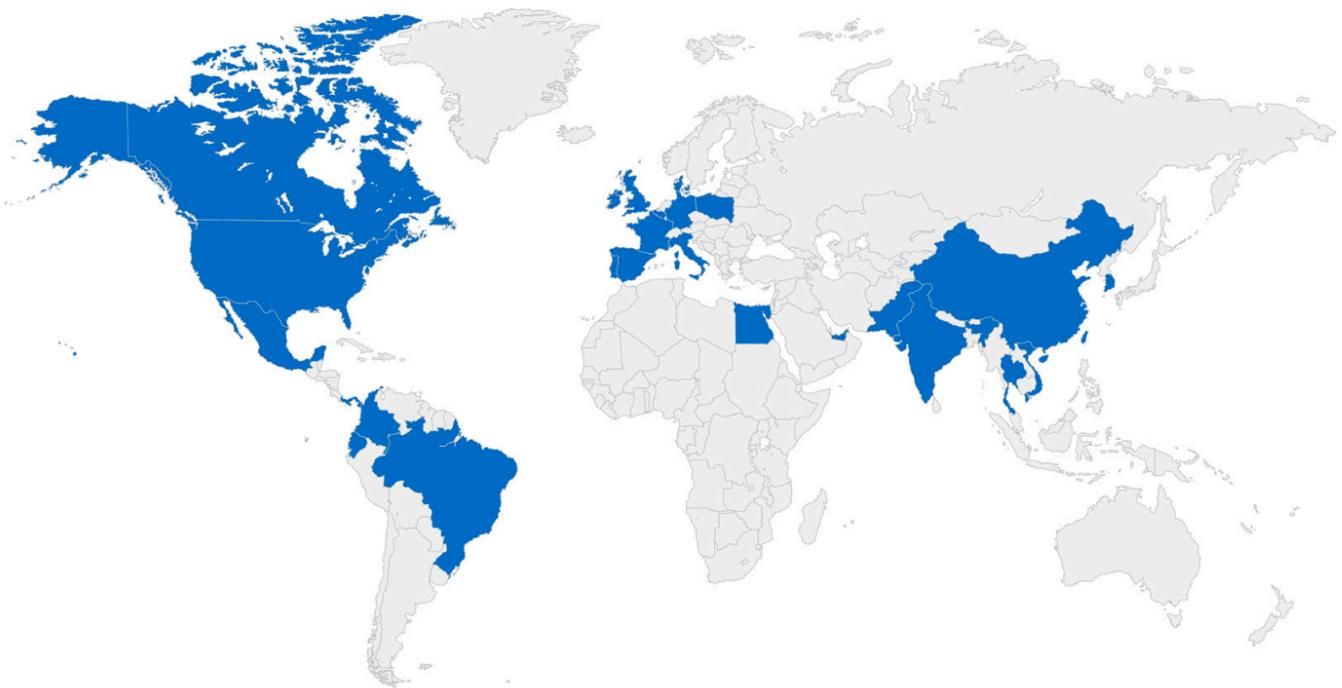


Figura 11. Distribuzione geografica di ceppi batterici positivi per *cfr*. In blu sono colorati i paesi in cui è stata riportata la presenza del gene.

1.2.4.1. Diffusione di *cfr* nel genere *Staphylococcus spp.*

Il gene *cfr*, dopo la sua prima identificazione in *S. sciuri* in un plasmide chiamato pSCFS1 (Figura 12), è stato identificato in un totale di 19 specie stafilococciche di origine sia umana che animale, incluse specie coagulasi-negative, coagulasi-positive e coagulasi-variabile (Schwarz *et al.*, 2021).

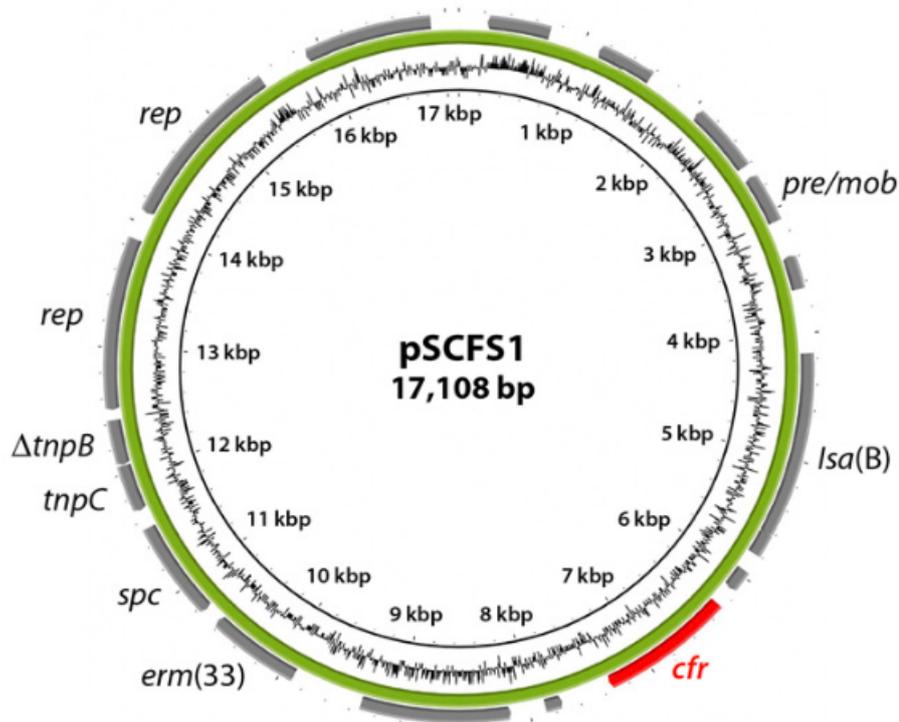
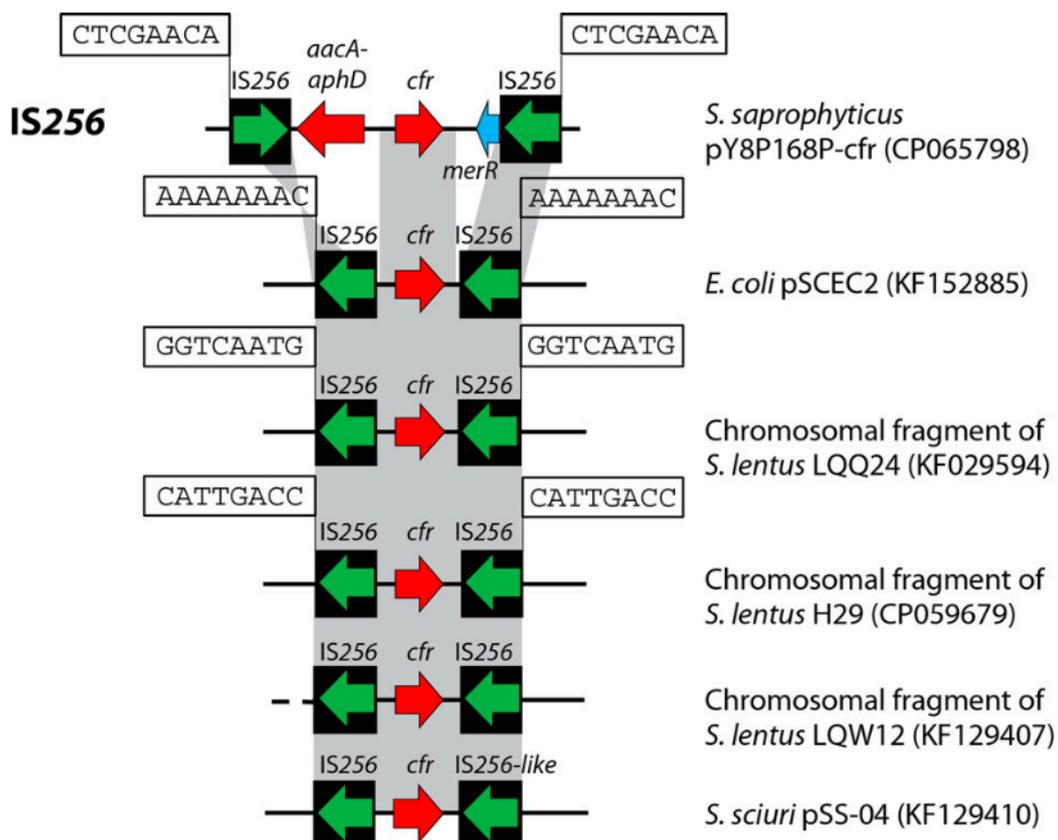


Figura 12. Rappresentazione schematica del plasmide pSCFS1 di *S. sciuri* isolato in Germania da un tampone nasale di bovino.

I plasmidi costituiscono i principali vettori del gene e differiscono per dimensione, struttura ed organizzazione. La dimensione dei plasmidi varia da 6.962 a 76.991 bp. È interessante notare che in questi elementi genetici *cfr* è spesso associato ad altri geni di antibiotico-resistenza o geni di resistenza ai metalli pesanti, che potrebbero garantire la permanenza di questo determinante nella popolazione batterica (Schwarz *et al.*, 2021).

Come evidenziato precedentemente il gene *cfr* risulta essere frequentemente fiancheggiato da elementi IS quali: IS256, IS21-558, IS431, ISEnfa4 (Figura 13): (i)

IS256, la prima sequenza d'inserzione ad esser stata scoperta in *S. aureus*, consiste in un'unica ORF che codifica per una trasposasi fiancheggiata da sequenze invertite imperfette; al momento della trasposizione, l'IS256 genera duplicazioni del sito bersaglio [*target site duplications* (TSDs)] di 8-9 bp. L'elemento è diffuso sia nel DNA cromosomico che nei plasmidi di Gram-positivi (stafilococchi ed enterococchi), raramente nei Gram-negativi. (ii) IS21-558, membro della famiglia IS21, consiste di due ORF sovrapposte. Il segmento recante *cfr*, delimitato da due copie di IS orientate nella stessa direzione, è stato inizialmente descritto in una variante del trasposone Tn558 in isolati suini di *S. warneri* e *S. simulans*. All'estremità delle due copie di IS21-558 è presente un TDS di 6 bp. (iii) ISEnfa4 è un elemento che appartiene alla famiglia delle IS256 e codifica per una singola trasposasi che porta all'estremità delle *inverted repeats* imperfette di 26 bp. (iv) IS431 detta anche IS257, sono diffuse in molte specie stafilococciche. (Schwarz *et al.*, 2021).



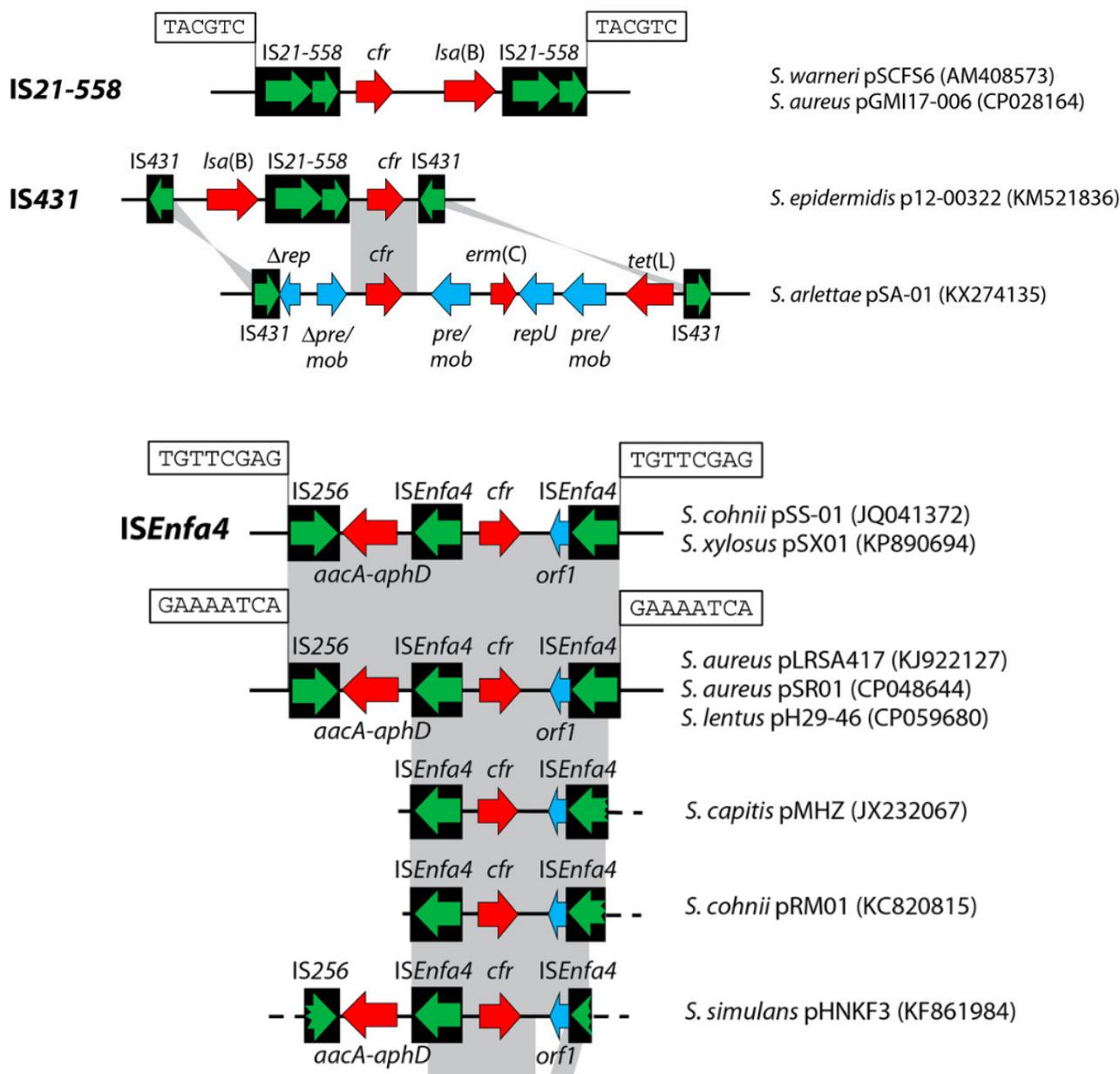


Figura 13. Sequenze di inserzione fiancheggianti il gene *cfr*. Le sequenze di inserzione IS256, IS21-558, IS431 e ISEnfa4 sono rappresentate da riquadri neri con frecce verdi all'interno che simboleggiano i rispettivi geni di trasposasi. Il gene *cfr* è mostrato come una freccia rossa.

Recentemente in Italia è stato identificato un ceppo *livestock associated* MRSA di origine suina (ST398) *cfr*-positivo ma sensibile al linezolid per la perdita di un'adenina in posizione 379 del gene strutturale con conseguente alterazione della cornice di lettura (Fioriti *et al.*, 2021).

Il gene *cfr* è stato anche identificato in isolati di origine suina quali ceppi MRSA appartenenti ai complessi clonali CC398 e CC9 in Spagna (Ruiz-Ripa *et al.*, 2021); il

gene è stato anche rilevato in ceppi di *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus arlettae* isolati da campioni di aria di un allevamento di suini con produzione intensiva (Ruiz-Ripa *et al.*, 2020).

1.2.4.2. Diffusione del gene *cfr* nel genere *Enterococcus*

Contrariamente a quanto evidenziato negli stafilococchi, il gene *cfr* è identificato raramente nel genere *Enterococcus*. Il primo plasmide *cfr*-positivo è stato segnalato nel 2010 in un isolato di *E. faecalis* di origine bovina in Cina (Liu *et al.*, 2012). La caratterizzazione genetica del plasmide di 32.388 bp, denominato pEF-01 (Figura 14), ha rilevato la presenza di un gene *cfr* codificante una proteina che differiva di due aminoacidi rispetto alla metilasi *wild-type* di *S. sciuri*. Inoltre, il contesto genetico contenente il determinante era caratterizzato dalla presenza di: (i) tre diversi geni *rep* suggerendo che questo plasmide poteva avere la capacità di replicarsi in diversi batteri – come confermato anche dalla sua capacità di replicarsi in *S. aureus* RN4220 – e quindi contribuire alla disseminazione del gene *cfr*; (ii) la presenza di più copie di IS1216 (tre intatte ed una troncata), molto diffuse nella specie enterococciche, che giocano un ruolo importante nella disseminazione del determinante di resistenza (Brenciani *et al.*, 2022); (iii) la presenza di un *toxin-antitoxin system*, per garantire la permanenza del plasmide nella popolazione enterococcica (Liu *et al.*, 2012).

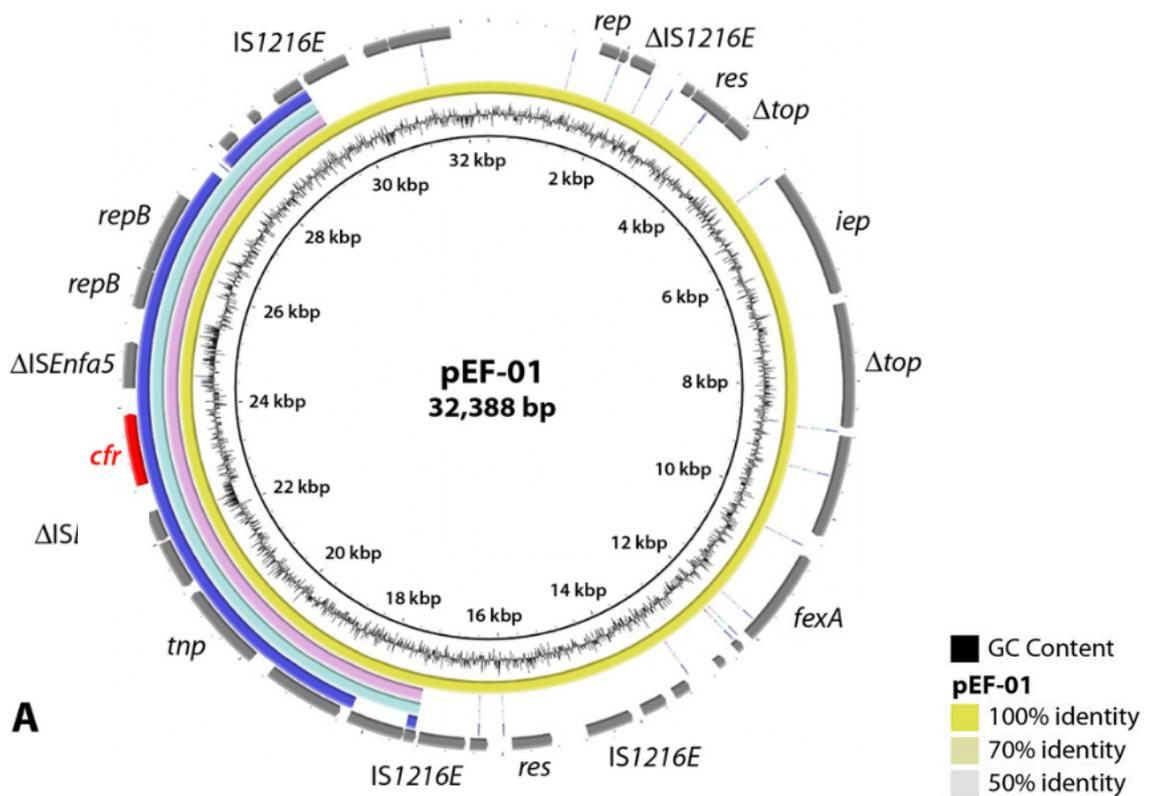


Figura 14. Mappa genetica del plasmide pEF-01 di *E. faecalis* di origine animale in Cina.

Nello stesso anno, Diaz e collaboratori hanno identificato il primo isolato di *E. faecalis* *cfr*-positivo di origine clinica e resistente al linezolid (Diaz *et al.*, 2012). Il contesto del gene *cfr*, localizzato su un plasmide coniugativo di circa 100 kb, mostrava sequenze di DNA simili a quelle di altri plasmidi *cfr* precedentemente identificati negli stafilococchi ma contrariamente da quanto osservato in pEF-01 conteneva la IS256 (Diaz *et al.*, 2012).

Da allora, studi successivi hanno descritto diversi plasmidi enterococcici *cfr*-positivi, sia di origine animale che umana, i cui contesti genetici mostravano un'ampia variabilità (Figura 15) (Brenciani *et al.*, 2022).

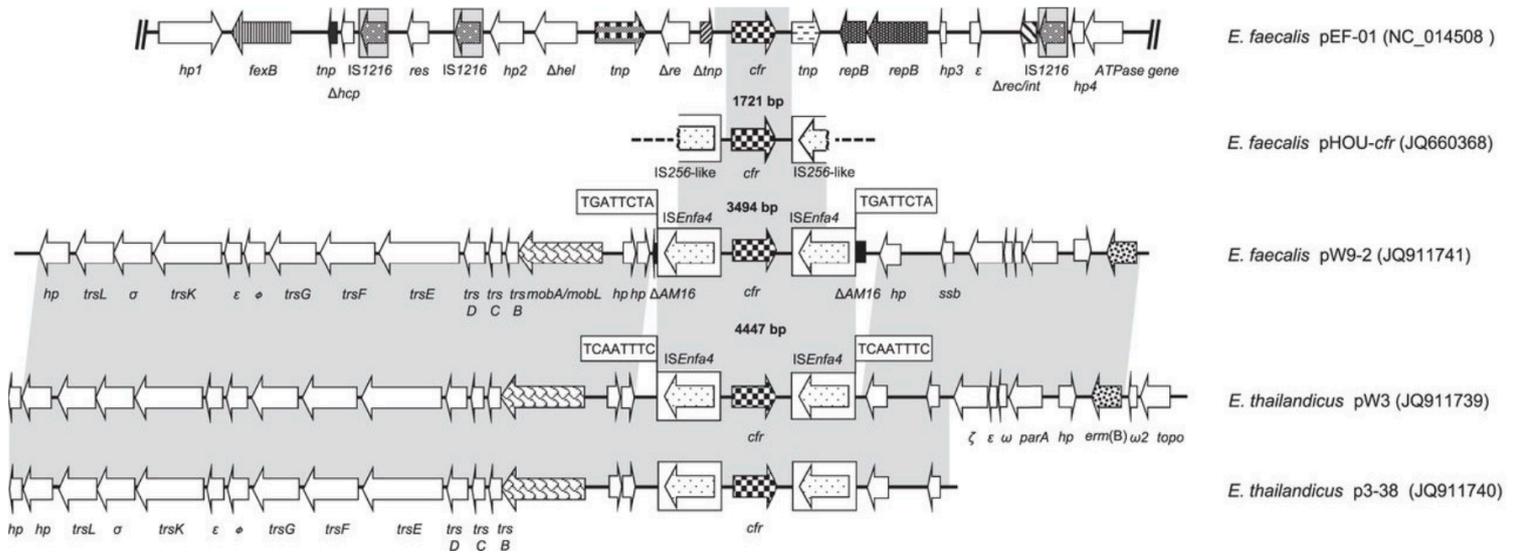


Figura 15. Comparazione dei contesti genetici plasmidici del gene *cfr* in *Enterococcus* spp.

Tuttavia, ancora oggi il contributo del gene *cfr* alla resistenza al linezolid nel genere *Enterococcus* spp. è ancora oggetto di discussione. È infatti stato dimostrato in singoli isolati che, probabilmente a causa di ragioni specifiche dell'isolato ancora sconosciute, la proteina Cfr non riesca a mediare la resistenza al linezolid e un fenotipo completo di resistenza a PhLOPS_A negli enterococchi (Brenciani *et al.*, 2022).

1.2.4.3. Diffusione del gene *cfr* in altri batteri Gram-positivi

La presenza del gene *cfr*, pur se esigua, è stata evidenziata anche in altri batteri Gram-positivi quali, *Bacillus* spp., *Streptococcus suis*, *Micrococcus caseolyticus* e *Jeotgalicoccus pinnipedialis*, tutti di origine suina in Cina (Schwarz *et al.*, 2021; Brenciani *et al.*, 2022). In particolare, nel genere *Bacillus* sono stati descritti tre tipi di plasmidi recanti *cfr*: (i) pBS-01 che portava anche una copia completa del trasposone Tn917 con il gene di resistenza *erm(B)*; (ii) pBS-02 con un background genetico simile a quello di pBS-01 ma privo del trasposone Tn917; (iii) pBS-03 che, oltre a *cfr*, veicolava il gene di resistenza alla streptomicina *aadY* (Schwarz *et al.*,

2021). In *S. suis*, il determinante di resistenza è stato identificato sia sul trasposone Tn6644 di un plasmide non coniugativo di circa 100 kb che su un'isola genomica associato ad altri geni di antibiotico-resistenza. In *M. caseolyticus* e *J. pinnipedialis*, *cfr* è stato trovato su plasmidi altamente correlati a quelli stafilococcici (Brenciani *et al.*, 2022).

1.2.4.4. Diffusione di *cfr* in batteri Gram-negativi

Sebbene molti batteri Gram-negativi, in particolari quelli appartenenti all'ordine degli *Enterobacterales*, risultino essere intrinsecamente resistenti ad alcune classi antimicrobiche a cui il gene *cfr* conferisce resistenza (lincosamidi, oxazolidinoni, streptogramine di gruppo A), questo determinante è stato identificato sporadicamente in isolati di origine animale appartenenti a generi Gram-negativi come *Escherichia*, *Proteus*, *Morganella*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Vibrio* e *Leclercia* (Schwarz *et al.*, 2021). La prima segnalazione del gene *cfr* in batteri Gram-negativi è stata evidenziata da Wang e collaboratori che isolano un ceppo di *Proteus vulgaris* florfenicolo-resistente di origine suina; il gene *cfr* era localizzato in un segmento cromosomico con alti livelli d'identità nucleotidica ad un plasmide stafilococcico (Wang *et al.*, 2011).

Il gene *cfr* è stato ulteriormente identificato in diversi isolati di *E. coli* di origine animale; qui il determinante era prevalentemente localizzato su plasmidi coniugativi multiresistenti che differivano per dimensione e *backbone* genetico (Brenciani *et al.*, 2022).

Nei batteri Gram-negativi la maggior parte dei contesti genetici contenenti il gene *cfr* sono fiancheggiati da due sequenze d'inserzione IS26 (IS26 – *cfr* – IS26) prevalentemente con lo stesso orientamento (Figura 16) (Brenciani *et al.*, 2022). La sequenza d'inserzione IS26, originariamente assegnata alla famiglia delle IS6, ha una dimensione di 820 bp e consiste di una ORF che codifica per una singola trasposasi

che sembra essere responsabile della diffusione del gene *cfr* nei batteri Gram-negativi (Schwarz *et al.*, 2021).

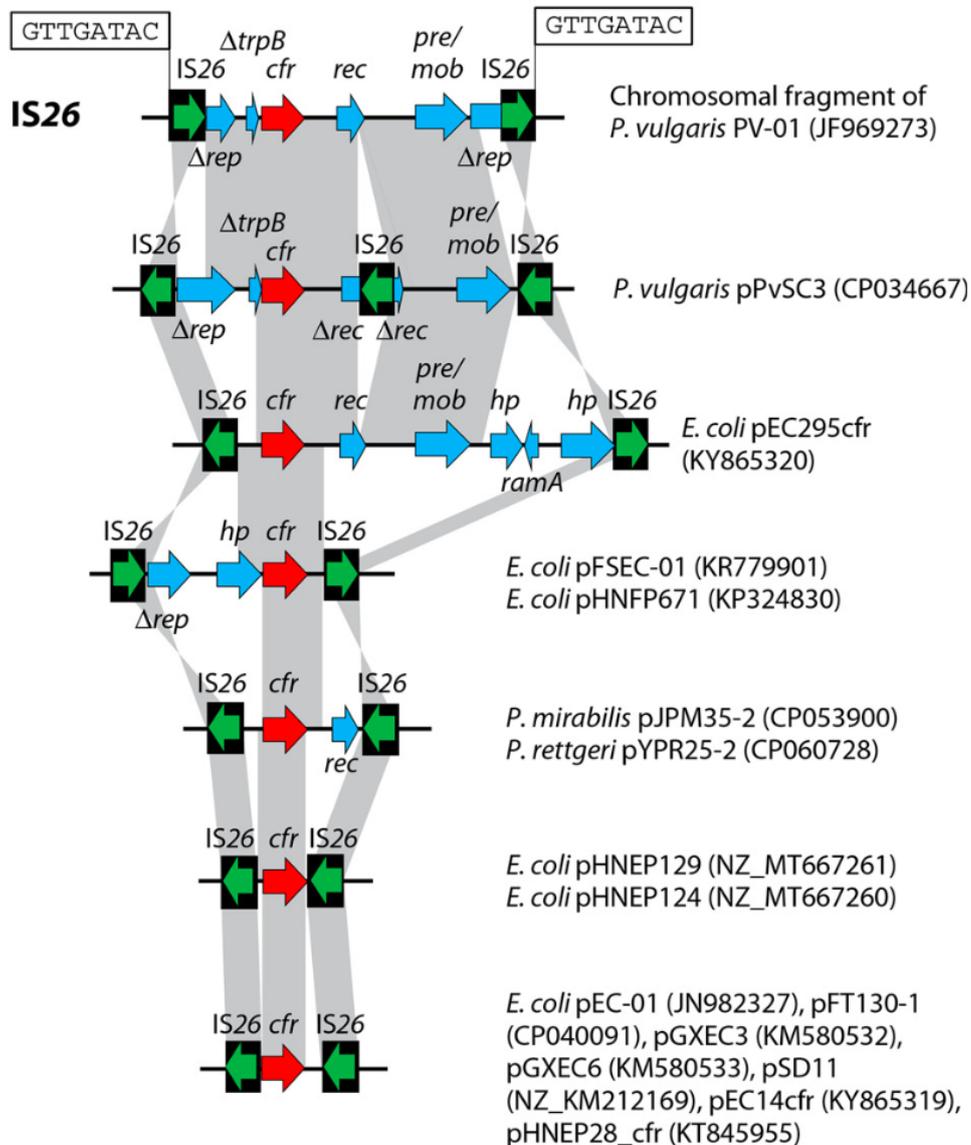


Figura 16. Sequenza d'inserzione IS26 fiancheggianti il gene *cfr* in batteri Gram-negativi. Le sequenze di inserzione sono rappresentate da riquadri neri con frecce verdi all'interno che simboleggiano i rispettivi geni di trasposasi. Il gene *cfr* è mostrato come una freccia rossa.

1.2.5. Il gene *cfr*(B)

Diversi anni dopo l'identificazione di *cfr*, una nuova variante del gene è stata identificata in sette ceppi di *Clostridioides difficile* (precedentemente conosciuti come *Clostridium difficile* o *Peptoclostridium difficile*) di origine umana con alti livelli

di resistenza al linezolid (MIC, 16-32 mg/L). Dalle analisi di sequenza è stato evidenziato che la proteina Cfr clostridiale mostrava un'identità amminoacidica del 75.1% con la proteina *wildtype* di *S. sciuri* (Schwarz *et al.*, 2015). Studi successivi hanno chiarito che anche il nuovo determinante di resistenza, chiamato *cfr*(B), conferiva il fenotipo PhLOPS_A. Successivamente, questa nuova variante è stata identificata anche in isolati di *E. faecalis* e di *E. faecium* di origine umana; le analisi comparative della proteina Cfr(B) enterococcica con quella clostridiale hanno evidenziato un'identità amminoacidica compresa tra il 99,7% e il 100% (Schwarz *et al.*, 2021). È interessante notare che gli enterococchi mostravano bassi livelli di resistenza al linezolid (MIC, 8 mg/L) e in questa specie il gene *cfr*(B) non determinava il fenotipo PhLOPS_A tipico di *cfr*.

In tutti gli isolati *cfr*(B) era localizzato su un trasposone cromosomico non coniugativo, appartenente alla famiglia del Tn916, denominato Tn6218 (Figura 17).

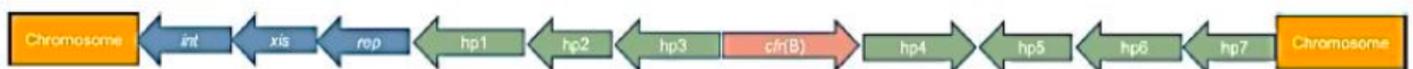


Figura 17. Rappresentazione schematica del trasposone Tn6218.

Questo trasposone mostrava differenti localizzazioni cromosomiche sia in *C. difficile*, che in *E. faecium* ed *E. faecalis* (Schwarz *et al.*, 2021). Il gene *cfr*(B) è stato rilevato anche su mega plasmidi con dimensioni superiori a 200 kb in isolati di *E. faecium* di origine umana (Brenciani *et al.*, 2022). Tutti gli elementi genetici conosciuti, contenenti il gene *cfr*(B), sono riassunti in Tabella 3.

Alcuni scienziati ritengono che entrambe le specie batteriche possano aver acquisito la resistenza nel suo habitat naturale, l'intestino umano, che può fungere da ampio reservoir di determinanti di resistenza (Penders *et al.*, 2013).

1.2.6. Il gene *cfr*(C)

Nel 2017, Tang *et al.* hanno identificato un'ulteriore variante del gene *cfr*, denominata *cfr*(C), in numerosi ceppi di *Campylobacter coli* isolati da campioni fecali di allevamenti di bestiame negli Stati Uniti. 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 esibiva un'alta similarità con la superfamiglia enzimatica delle S- adenosilmetionina e mostrava un'identità amminoacidica rispettivamente del 55.4% and 52.2% con le proteine Cfr di *S. sciuri* e Cfr(B) di *E. faecium*, (Tang *et al.*, 2017; Brenciani *et al.*, 2022). La nuova variante era in grado di conferire resistenza a fenicoli, lincosamidi, pleuromutiline e oxazolidinoni (fenotipo PhLOPS_A). Il sequenziamento genomico ha evidenziato che il gene *cfr*(C) era localizzato su un plasmide coniugativo di 48 kb, chiamato pTx40, in cui il gene era associato ad altri determinanti genetici quali: *tet*(O) ed *aphA-3* responsabili rispettivamente della resistenza alla tetraciclina e agli amminoglicosidi (Figura 18). Il gene *cfr*(C) è stato il primo caso di variante *cfr* identificato in un agente patogeno di origine alimentare. Ad oggi, *cfr*(C) è principalmente osservato in isolati di *Campylobacter* ma non è da sottovalutare la sua potenziale diffusione ad altre specie batteriche dato che il gene è localizzato su un plasmide coniugativo (Tang *et al.*, 2017).

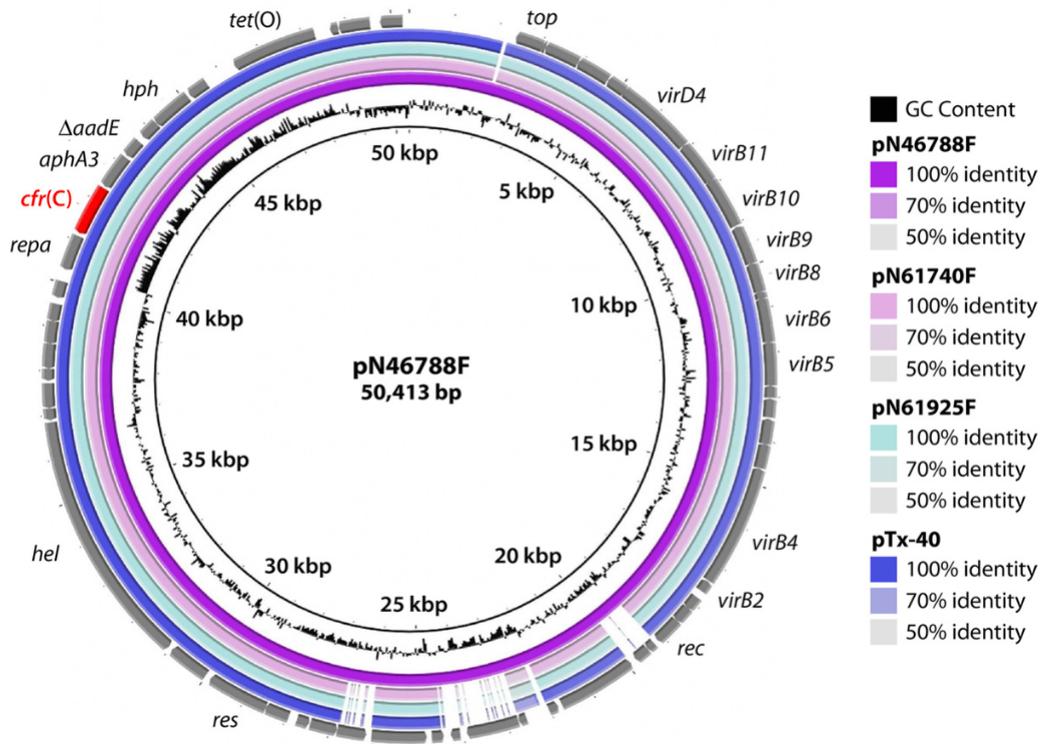


Figura 18. Confronto strutturale mediante BRIG di plasmidi recanti di *cfrC* in *C. coli*. Geni rilevanti con funzioni note ed elementi di inserzione sono indicati nell’anello esterno. Il gene *cfrC* è indicato in rosso.

Il cerchio più interno fornisce una scala dimensionale, mentre il successivo cerchio più interno mostra il contenuto GC. Altri plasmidi utilizzati per il confronto sono indicati da anelli codificati a colori, con il plasmide di riferimento che rappresenta l’anello colorato più interno. I plasmidi utilizzati per questo confronto sono pN46788F, pN61740F, pN61925F e pTx-40.

Successivi studi condotti in Cina, hanno riportato l’identificazione di varianti del gene anche in isolati di *C. coli* di origine suina ed avicola; le analisi di sequenza mostravano variazioni da due a sei amminoacidi rispetto all’originale CfrC riportato negli USA (Tabella 2).

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

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

^aVariante: 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

Tuttavia, queste varianti non erano funzionali nel *background* genetico di *C. coli*, mentre se clonate ed espresse in *Campylobacter jejuni* erano in grado di determinare resistenza ai fenicoli (Liu *et al.*, 2019).

È interessante notare che tutte le varianti *cfr*(C) (elencate in Tabella 2) erano localizzate su nuove isole genomiche cromosomiche contenenti numerosi geni di resistenza antimicrobica proveniente da batteri Gram-positivi (Brenciani *et al.*, 2022).

Il gene *cfr*(C) è stato anche identificato in Francia in batteri Gram-positivi anaerobi di origine clinica come *C. difficile* e *Clostridium boltea*. In questi batteri il determinante era localizzato in tre *Integrative and Conjugative Element* (ICE) cromosomici: ICE_{DA275}, ICE_{F548} and ICE_{90B3} (Candela *et al.*, 2017). In due isolati di *C. difficile* provenienti da ospedali greci, *cfr*(C) era individuato su un piccolo plasmide

chiamato pCd13-Lar, mentre in isolati clinici di *C. difficile* provenienti da stati dell'America centrale, è stato trovato in un elemento genetico simile all'ICE_{F548}. Molto recentemente, un *cfr(C)* cromosomico è stato nuovamente identificato in Cina in isolati di origine bovina (Zhang *et al.*, 2021). Gli elementi genetici recanti questo determinante di resistenza sono riassunti in Tabella 3.

1.2.7. Il gene *cfr(D)*

Il gene *cfr(D)* è stato documentato per la prima volta nel 2015 in Francia in un isolato clinico di *E. faecium* linezolid-resistente (Sassi *et al.*, 2019) e nel 2020 identificato in un ceppo di *E. faecium* isolato da emocoltura di un paziente australiano (Pang *et al.*, 2019). Il gene *cfr(D)* codifica una proteina di 357 aminoacidi che mostra un'identità amminoacidica rispettivamente del 65.3%, 64.1% e 49.1% con le proteine Cfr, Cfr(B) e Cfr(C). Negli isolati clinici di *E. faecium*, analisi genomiche hanno evidenziato *cfr(D)* su due plasmidi coniugativi rispettivamente di 11 kb (plasmide 2) e 103 kb (plasmide 4); un'analisi approfondita del contesto genetico di *cfr(D)* nei due plasmidi, ha mostrato la presenza di IS1216 fiancheggianti il determinante di resistenza e l'associazione con il gene *guaA*, codificante una guanosina monofosfato sintetasi, completo nel plasmide 4 o troncato nel plasmide 2 (Figura 19) (Guerin *et al.*, 2020; Brenciani *et al.*, 2022).

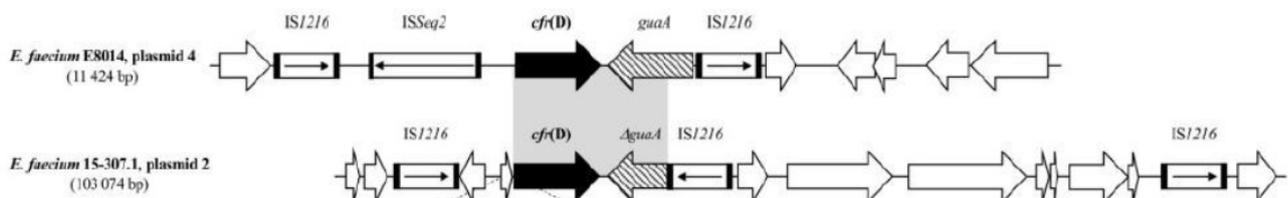


Figura 19. Rappresentazione schematica del contesto genetico di *cfr(D)*. Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni. I determinanti di antibiotico resistenza sono indicati da frecce nere. Le aree ombreggiate in grigio rappresentano regioni con un'identità di sequenza nucleotidica > 99%. In ogni riquadro sono state mostrate la localizzazione di *cfr(D)* e gli isolati (a destra).

La funzionalità del gene *cfr(D)* è stata analizzata mediante saggi di clonaggio: quando espresso nel *background* genetico di *E. faecium* e in *E. faecalis cfr(D)* non era in grado di conferire alcun tipo di resistenza, mentre in *E. coli* determinava il fenotipo di resistenza PhLOPS_A tipico del gene *cfr*. Sulla base di tali 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 “silente” del gene *cfr(D)* (Guerin *et al.*, 2020). La presenza di *cfr(D)* è stata ulteriormente documentata in isolati di *E. faecalis* provenienti da ospedali spagnoli, cinesi e scozzesi, in isolati di enterococchi di origine suina e da letame in Italia e da animali destinati alla produzione alimentare in Korea. Il determinante di resistenza è stato riportato anche in *Streptococcus parasuis* e in isolati di *Vagococcus lutrae* di origine suina in Cina (Brenciani *et al.*, 2022).

Tutti gli elementi genetici-*cfr(D)* conosciuti fino ad oggi, sono elencati in Tabella 3.

Tabella 3. Elementi genetici recanti geni *cfr*-like attualmente conosciuti

Specie batterica	Origine (Paese)	Elemento genetico (kb)	Numero d'accesso
<i>cfr(B)</i>			
<i>C. difficile</i> Ox2167	Umana (UK)	Tn6218 (8.7)	HG002396
<i>C. difficile</i> Ox3196	Umana (UK)	Tn6218 (11.3)	HG002389
<i>C. difficile</i> PUC51	Umana (Cile)	Elemento sconosciuto	CAADRH000000000
<i>C. difficile</i> PUC347	Umana (Cile)	Elemento sconosciuto	CAADRI000000000
<i>E. faecium</i> 448-18961R	Umana (USA)	Tn6218 (8.4)	KR610408
<i>E. faecium</i> UW11590	Umana (Germania)	Tn6218 (~10.2)	SRP078305
<i>E. faecium</i> UW11733	Umana (Germania)	Tn6218 (~9.7)	SRP078305
<i>E. faecium</i> UW11858	Umana (Germania)	ΔTn6218 (~4.1)	SRP078305
<i>E. faecium</i> UW12712	Umana (Germania)	ΔTn6218 on plasmid (~300)	SRP078305
<i>E. faecium</i> UW10882	Umana (Germania)	Tn6218 on plasmid (~200)	SRP078305
<i>E. faecium</i> E7948	Umana (Olanda)	plasmid 2 (293.8)	LR135358
<i>E. faecium</i> 687669, 687671	Umana (Panama)	Tn6218-like (8.4)	KR610408
<i>E. faecalis</i> KUB3006	Umana (Giappone)	Tn6218 (11.3)	AP018538
<i>cfrC</i>			

<i>C. coli</i> Tx40	Bestiame (USA)	pTx40 (48)	KX686749
<i>C. coli</i> SHP40	Suino (Cina)	Isola genomica (20)	MF037584
<i>C. coli</i> SHP63	Suino (Cina)	Isola genomica (17.7)	MF037585
<i>C. coli</i> SHP35	Suino (Cina)	Isola genomica (12.7)	MF037586
<i>C. coli</i> CVM N61925F	Bestiame (USA)	pN61925F (48)	MK541989
<i>C. coli</i> CVM N61740F	Bestiame (USA)	pN61740F (48)	MK541988
<i>C. coli</i> CVM N46788F	Bestiame (USA)	pN46788F (50.4)	MK541987
<i>C. coli</i> JZ_1_79	Suino (Cina)	pJZ_1_79 (62.4)	CP047213
<i>C. coli</i> SH89	Suino (Cina)	pSH89 (57.3)	CP047217
<i>C. coli</i> JP10	Suino (Cina)	Frammento cromosomico (19.5)	MT107515
<i>C. coli</i> SH96	Suino (Cina)	Frammento cromosomico (19.6)	MT107516
<i>C. coli</i> JZ_1_74	Suino (Cina)	Frammento cromosomico (9)	MT107517
<i>C. coli</i> JZ_1_53	Suino (Cina)	Frammento cromosomico (9.4)	MT107518
<i>C. coli</i> JZ_2_24	Suino (Cina)	Frammento cromosomico (10.8)	MT107519
<i>C. difficile</i> DA00275	Umana (USA)	ICEDA275 (NA)	NA
<i>C. difficile</i> F548	Umana (USA)	ICEF548 (NA)	NA
<i>C. difficile</i> Cd-13Lar	Umana (Grecia)	pCd13-Lar (6.9)	MH229772
<i>C. difficile</i> HON10	Umana (Honduras)	F548-like ICE (NA)	NA
<i>C. difficile</i> LIBA5707	Umana (Costa Rica)	F548-like ICE (NA)	NA
<i>C. bolteae</i> 90B3	Umana (Francia)	ICE90B3 (24)	NA
<i>C. perfringens</i> 19TSBNCP	Bestiame (Cina)	Frammento cromosomico (15.9)	CP073070
cfr(D)			
<i>E. faecium</i> 15-307-1	Umana (Francia)	p15-307-1_02 (103)	CP044318
<i>E. faecium</i> E8014	Umana (Olanda)	Plasmide 4 (11.4)	LR135354
<i>E. faecium</i> M17/0314	Umana (Irlanda)	pM17/0314 (103.6)	MN831413
<i>E. faecium</i> BP5067	Umana (India)	pBP5067_P1(122.1) pBA17124_P1	CP059807
<i>E. faecium</i> BA17124	Umana (India)	(130.5)	CP059785
<i>E. faecalis</i> EF36	Alimenti (Korea)	pEFS36_2 (35.8)	NZ_CP085293
<i>E. faecalis</i> EF108	Alimenti (Korea)	pEFS108_1 (97.5)	NZ_CP085295
<i>E. faecalis</i> V386	Allevamenti (Italia)	pV386 (33.4)	MZ603802
<i>S. parasuis</i> H35	Suino (Cina)	pH35-cfrD (7.5)	CP076722
<i>V. lutrae</i> BN31	Suino (Cina)	pBN31-cfrD (33.5)	CP081834
<i>E. faecalis</i> BX8117	Umana (Scozia)	pBX8117-2 (NA)	PRJEB36950

1.2.8. Il gene *cfr(E)*

La variante più recente di *cfr*, denominata *cfr(E)*, è stata scoperta in Messico, in un ceppo clinico di *C. difficile* con elevati livelli di resistenza al linezolid e isolato da un paziente di tre anni con diarrea (Stojkovic *et al.*, 2019). Mediante analisi BLASTP La

proteina Cfr(E), mostrava un'identità amminoacidica compresa fra il 52 e il 58 % con le altre proteine Cfr precedentemente descritte; studi funzionali chiarivano tuttavia che il gene era in grado di conferire il fenotipo PhLOPS_A (Stojkovic *et al.*, 2019). Il *Whole Genome Sequencing* del ceppo ha rilevato il gene *cfr*(E) in un elemento genetico non caratterizzato che mostrava similarità nucleotidiche a sequenze genomiche di vari *Firmicutes* intestinali (Brenciani *et al.*, 2022).

1.2.9. Il gene *optrA*

Un ulteriore meccanismo di resistenza trasferibile agli oxazolidinoni, diffuso prevalentemente in *E. faecalis*, è quello codificato dal gene *optrA* (*oxazolidinone phenicol transferable resistance*). Il gene è stato per la prima volta identificato in Cina nel 2015 in un isolato clinico di *E. faecalis* (E349) resistente al linezolid e privo sia delle varianti *cfr* che delle mutazioni ribosomiali (Wang *et al.*, 2015). Il gene, responsabile della resistenza ai fenicoli e agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid), era localizzato su un plasmide coniugativo di 36.331 bp, denominato pE349, e associato a *fexA* responsabile della resistenza ai fenicoli (Figura 20).

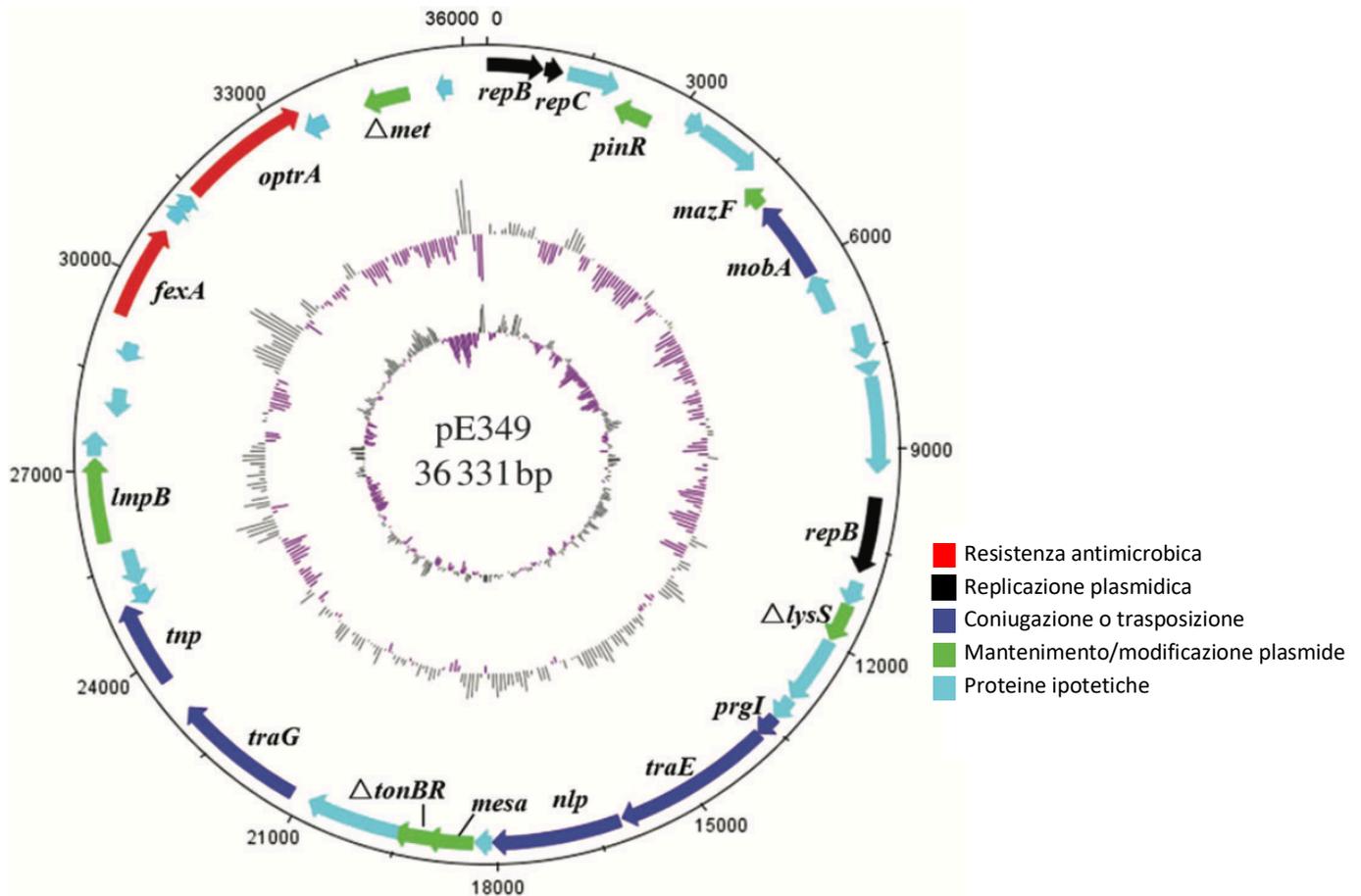


Figura 20. Rappresentazione schematica del plasmide pE349 di *E. faecalis* E349

La proteina OptrA (OptrA_{E349}) mostrava un'identità amminoacidica del 99% con le proteine appartenenti alla famiglia *ABC-transporter* di enterococchi di origine umana. Studi successivi hanno 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 legandosi alla regione A del sito PTC. Dal confronto delle analisi strutturali è emerso che queste proteine sono caratterizzate dalla presenza di due domini di legame nucleotidici (in particolare per l'ATP) collegati da un dominio *linker*, la cui lunghezza e composizione sembrano determinare la specificità della resistenza agli antibiotici. Tuttavia, a differenza di altri membri della sottofamiglia che eliminano attivamente antibiotici fuori dalle cellule, le proteine ARE ABC-F (linea F della superfamiglia delle *ATP-binding protein* associate con antibiotico resistenza) sono prive del dominio

transmembrana tipico dei trasportatori di membrana (Ero *et al.*, 2019). Alcuni studi recenti hanno quindi dimostrato che OptrA è in grado di conferire antibiotico-resistenza attraverso un meccanismo di protezione del ribosoma batterico (Brenciani *et al.*, 2022). Le proteine di protezione ABC-F si legano alla subunità 50S del ribosoma batterico, precedentemente legato all'antibiotico, provocandone la modificazione conformazionale e determinando il rilascio del farmaco. Successivamente, mediante idrolisi di ATP, la proteina ABC-F viene rilasciata dal ribosoma consentendo quindi alla cellula di riprendere la traduzione. (Ero *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2020) (Figura 21).

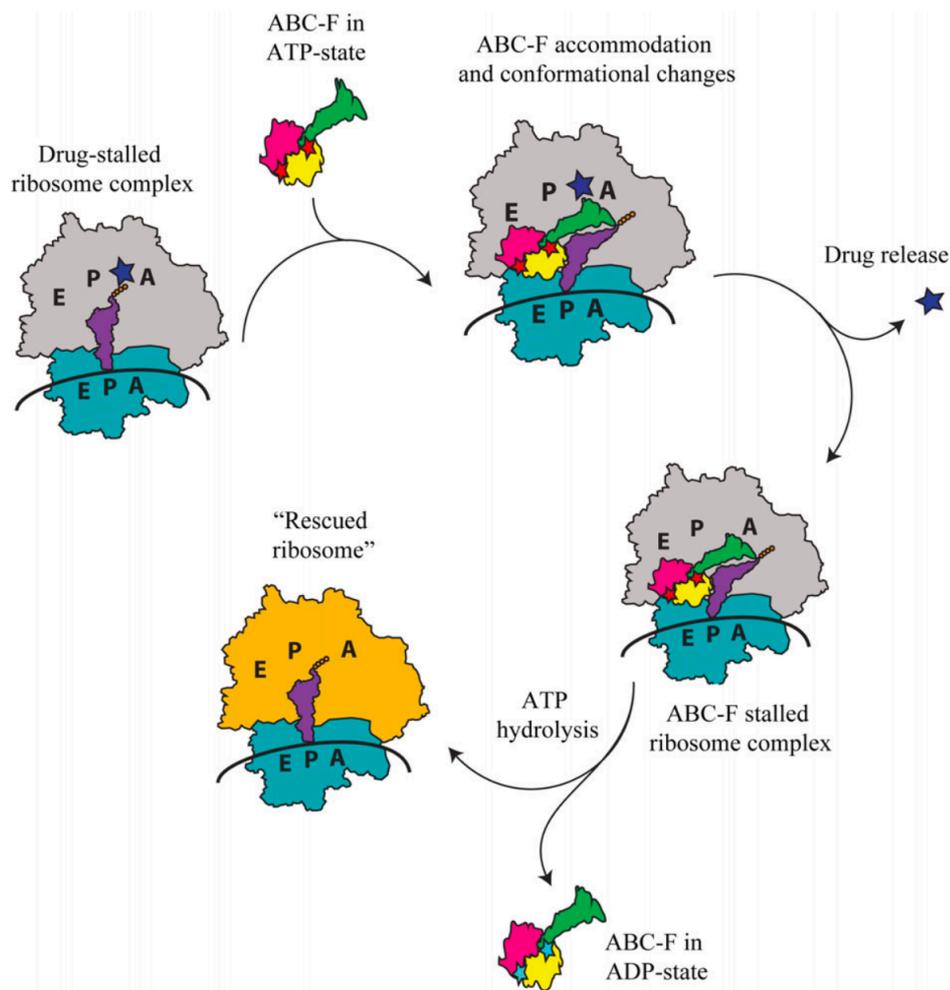


Figura 21. Rappresentazione schematica del meccanismo di protezione ribosomiale mediato dalla proteina ARE ABC-F.

Sebbene il gene *optrA* sia stato identificato per la prima volta in Cina in un isolato enterococcico, la sua presenza, ad oggi, è stata segnalata sia in batteri Gram-positivi (*S. aureus*, *S. sciuri* e *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus suis* e *Streptococcus gallolyticus*, *Aerococcus viridans*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, in ceppi anaerobi di *Clostridium perfringens*) che Gram-negativi (*C. coli* di origine animale ad esempio) in 29 paesi di sei continenti diversi, 18 dei quali caratterizzati dalla presenza di ceppi *cfr*-positivi (Figura 22) (Brenciani *et al.*, 2022).

Nonostante *optrA* sia stato identificato in batteri isolati da differenti fonti (animali, alimenti di origine animale, prodotti vegetali e ambiente) numerosi hanno evidenziato che il determinante risulta essere prevalentemente diffuso in enterococchi di origine animale, considerati un importante serbatoio per la diffusione del gene di resistenza (Tamang *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2018; Schwarz *et al.*, 2021; Brenciani *et al.*, 2022). Il fenomeno è probabilmente legato all'uso eccessivo di florfenicolo in zootecnica per il trattamento di infezioni enteriche, respiratorie e genitali. Inoltre, una volta escreto, il florfenicolo rimane bioattivo nel suolo e potrebbe esercitare una pressione selettiva anche sui batteri ambientali, promuovendo la diffusione dei geni di resistenza agli oxazolidinoni (Cavaco *et al.*, 2017)

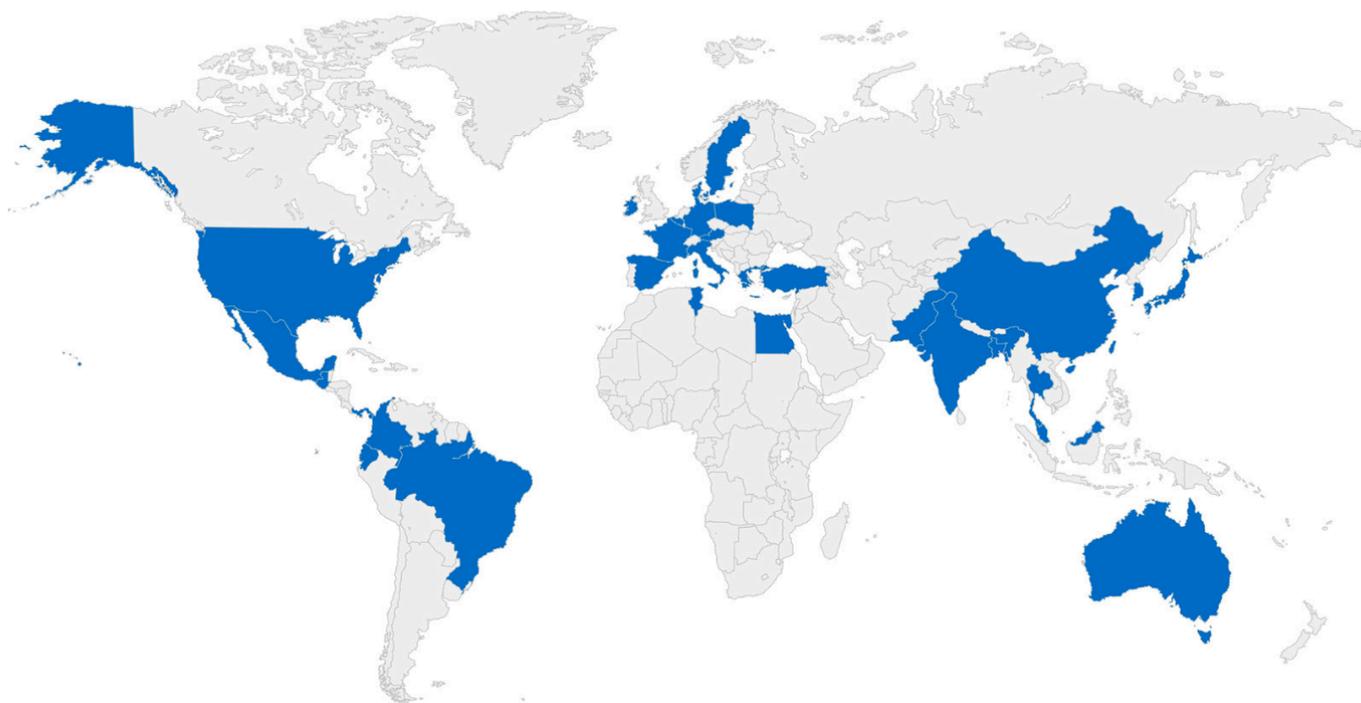


Figura 22. Distribuzione geografica di batteri positivi per *optrA*. In blu i paesi che riportano la presenza del determinante di resistenza.

L' ampia diffusione del gene *optrA*, è giustificata dalla presenza del determinante di resistenza in differenti MGEs quali plasmidi, profagi, ICEs e trasposoni e raramente nel cromosoma (Brenciani *et al.*, 2022). All'interno di questi elementi genetici mobili, il gene *optrA* è spesso associato al gene *fexA* e ad altri determinanti di resistenza, suggerendo che *optrA* può persistere e diffondersi anche grazie alla pressione selettiva esercitata da antibiotici diversi da quelli responsabili del fenotipo PhLOPS_A, come precedentemente osservato per il gene *cfr* (Torres *et al.*, 2018).

È interessante notare che, *optrA*, è frequentemente fiancheggiato da due copie identiche di IS1216 con orientamento uguale od opposto (Figura 23). Quando queste copie di IS ricombinano, viene generata un'unità traslocabile, nota anche come *minicircle*, che può integrarsi in plasmidi, ICE o in siti differenti del cromosoma promuovendo quindi la mobilità intra- ed inter- specie del gene (Schwarz *et al.*, 2021).

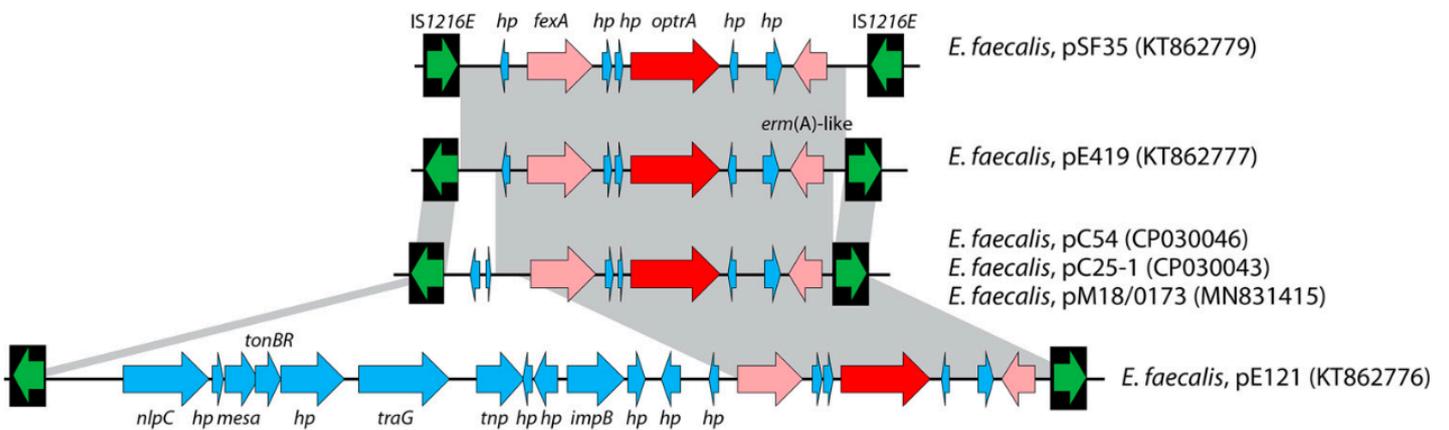
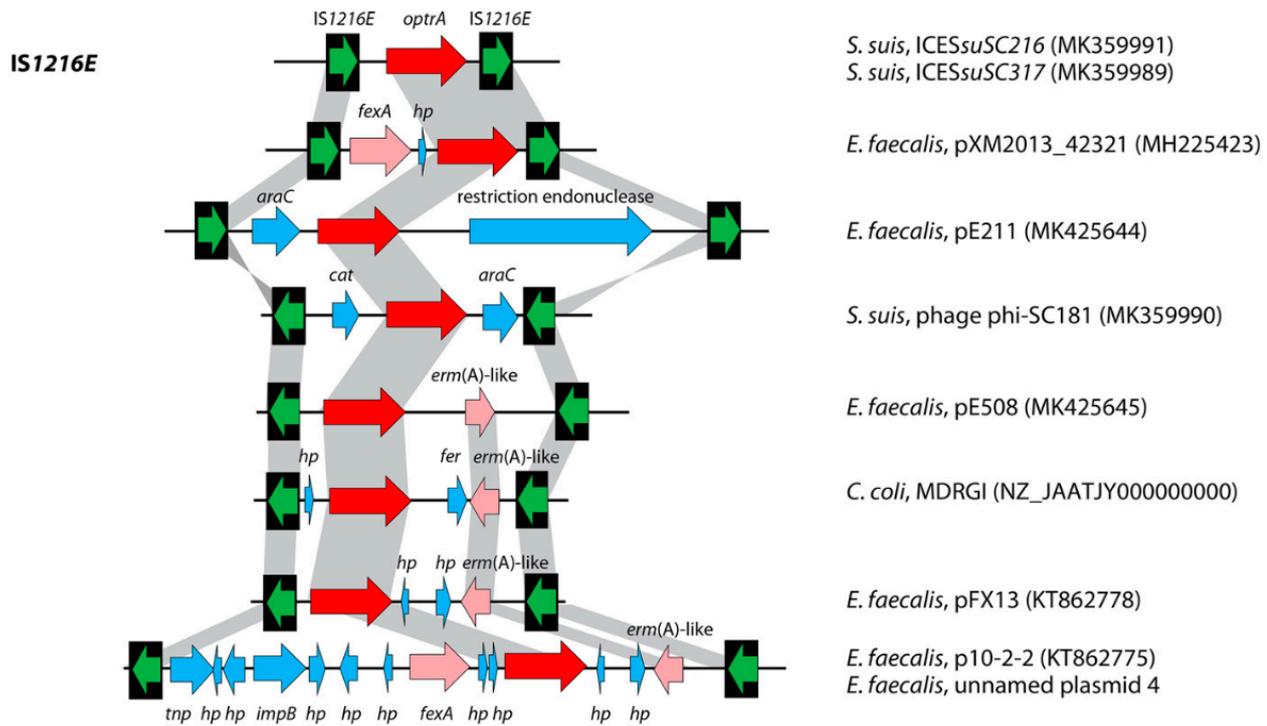


Figura 23. Sequenze di inserzione IS1216E fiancheggianti il gene *optrA*. Le sequenze di inserzione sono indicate da un riquadro nero con una freccia verde che ne indica la direzione. Il gene *optrA* è indicato da una freccia rossa.

Nella maggior parte dei generi batterici, *optrA* è localizzato su plasmidi coniugativi ma può essere presente anche su trasposoni cromosomici tutti integrati nel gene *radC*: (i) Tn6647, un derivato del trasposone Tn554 e identificato per la prima volta in un isolato suino di *E. faecalis* in Cina, e successivamente trovato in diversi ceppi

di *E. faecalis* di origine umana; (ii) Tn6823, una variante del trasposone Tn558, è identificato in isolati di *S. aureus* di origine avicola, in *S. sciuri* di origine suina ed in *E. faecium* di origine umana, tutti provenienti dalla Cina; (iii) Tn6261 trovato un isolato suino di *E. faecalis* in Cina, presente anche ICE e profagi (Schwarz *et al.*, 2021).

Una caratteristica distintiva del gene *optrA* è la sua ampia variabilità nucleotidica che si riflette nella sequenza amminoacidica. Infatti, poco dopo l'identificazione del gene, due studi sulla prevalenza del determinante negli enterococchi di origine clinica ed animale in Cina, hanno evidenziato la presenza di diverse varianti della proteina OptrA (Cai *et al.*, 2015, Cui *et al.*, 2016) (Tabella 4); tutte le varianti alleliche hanno mostrato sostituzioni amminoacidiche il cui impatto sul fenotipo di resistenza non è ad oggi del tutto chiarito. Recentemente, Schwarz *et al.*, hanno ipotizzato che alcune varianti proteiche (D, EDP, KD, KLDP, RD, RDK e RDKP) si trovino più comunemente negli isolati resistenti al linezolid rispetto ad altre (DDTD, EYDM, EYDDK, EYDNDM e KDTP) maggiormente diffuse in isolati sensibili a questo antibiotico. Uno studio successivo, che documenta la prima comparsa del gene *optrA* in Italia in due ceppi di *E. faecium* isolati da emocoltura (Brenciani *et al.*, 2016), ha inoltre evidenziato che la variante italiana (OptrA_{E35048}) differisce dal *wild-type* (E349) molto più (20 sostituzioni amminoacidiche) di quanto non avvenga con le varianti cinesi che mostrano un limitato numero di sostituzioni (Morrone *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2021) (Tabella 4).

Tabella 4. Varianti amminoacidiche di OptrA identificate fino ad oggi

Sequenza		Isolato
Variante OptrA	Sostituzione amminoacidica ^a	Specie batterica
Wild type (OptrA _{E349})		<i>E. faecalis</i> <i>S. suis</i> <i>E. faecium</i>
D_1	Y176 <u>D</u>	<i>S. suis</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>

D_2	G40 <u>D</u> , R239_	<i>E. faecalis</i>
DC	Y176 <u>D</u> , Y601 <u>C</u>	<i>S. suis</i>
DD_1	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
DD_2	G40 <u>D</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
DD_3	Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
		<i>E. faecium</i>
		<i>E. faecalis</i>
		<i>E. casseliflavus</i>
		<i>S. sciuri</i>
DD_4	Y176 <u>D</u> , G394 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
DK	Y176 <u>D</u> , E256 <u>K</u>	<i>E. faecalis</i>
DM	Y176 <u>D</u> , I622 <u>M</u>	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. casseliflavus</i>
DP	G40 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
DP_2	Y176 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
		<i>E. faecalis</i>
		<i>Enterococcaceae</i>
DS	Y176 <u>D</u> , G394 <u>S</u>	<i>E. faecalis</i>
DDD	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
		<i>E. faecium</i>
DDM	Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u> , I622 <u>M</u>	<i>E. faecium</i>
DDP	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
DDP_2	G40 <u>D</u> , G393 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>E. faecalis</i>
		<i>S. suis</i>
DGP	Y176 <u>D</u> , S411 <u>G</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
DVD	Y176 <u>D</u> , I235 <u>V</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
DVD_2	Y176 <u>D</u> , A350 <u>V</u> , G393 <u>D</u>	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. faecium</i>
DDKD	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u> , I287 <u>K</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. suis</i>
DDTD	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u> , P179 <u>T</u> , G393 <u>D</u>	<i>E. faecalis</i>
DNDM	Y176 <u>D</u> , D247 <u>N</u> , G393 <u>D</u> , I622 <u>M</u>	<i>S. sciuri</i>
DRDK	G40 <u>D</u> , I104 <u>R</u> , Y176 <u>D</u> , E256 <u>K</u>	<i>S. suis</i>
DDKDP	G40 <u>D</u> , Y176 <u>D</u> , E290 <u>K</u> , G393 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
E	K3 <u>E</u>	<i>E. faecalis</i>
E_2	D401 <u>E</u>	<i>E. faecalis</i>
ED	K3 <u>E</u> , Y176 <u>D</u>	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. faecium</i>
ED_2	K3 <u>E</u> , G393 <u>D</u>	<i>Enterococcaceae</i>
EDD	K3 <u>E</u> , Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u>	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. gallinarum</i>
		<i>S. sciuri</i>
		<i>E. faecium</i>

EYD	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u>	<i>S. suis</i>
EDM	<u>K3E</u> , <u>Y176D</u> , <u>I622M</u>	<i>E. faecalis</i>
EDP	<u>K3E</u> , <u>Y176D</u> , <u>T481P</u>	<i>E. faecium</i>
EDDD	<u>K3E</u> , <u>G40D</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u>	<i>E. faecium</i>
EDDD_2	<u>K3E</u> , <u>G87D</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u>	<i>E. faecalis</i>
EDDM	<u>K3E</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u> , <u>I622M</u>	<i>E. faecalis</i>
EDVD	<u>K3E</u> , <u>Y176D</u> , <u>I235V</u> , <u>G393D</u>	<i>E. faecium</i>
EYDD	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u>	<i>S. suis</i>
		<i>S. sciuri</i>
		<i>Salmonella sp.</i>
EYDE	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>G40D</u> , <u>Y176E</u>	<i>S. suis</i>
EYDM	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>I622M</u>	<i>E. faecium</i>
EYDP	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>G40D</u> , <u>T481P</u>	<i>S. suis</i>
EYDDD	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>G40D</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u>	<i>E. faecium</i>
		<i>S. suis phage SC181</i>
EYDDK	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>G393D</u> , <u>E583K</u>	<i>S. sciuri</i>
EYDND	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>D247N</u> , <u>G393D</u>	<i>S. simulans</i>
EYDRC	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>G40D</u> , <u>K130R</u> , <u>Y135C</u>	<i>S. suis</i>
EYDNDM	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>D247N</u> , <u>G393D</u> , <u>I622M</u>	<i>S. aureus</i>
		<i>S. sciuri</i>
		<i>E. faecalis</i>
		<i>E. avium</i>
EYDVDM	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>I235V</u> , <u>G393D</u> , <u>I622M</u>	<i>S. suis</i>
EYDNKDM	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>Y176D</u> , <u>D247N</u> , <u>Q310K</u> , <u>G393D</u> , <u>I622M</u>	<i>L. monocytogenes</i>
EYDDNDGPM	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>G40D</u> , <u>Y176D</u> , <u>D247N</u> , <u>G393D</u> , <u>S411G</u> , <u>T481P</u> , <u>I622M</u>	<i>E. faecalis</i>
EDELYNKQLEIG	<u>K3E</u> , <u>Y176D</u> , <u>Q541E</u> , <u>M552L</u> , <u>N560Y</u> , <u>K562N</u> , <u>Q565K</u> , <u>E614Q</u> , <u>I627L</u> , <u>D633E</u> , <u>N640I</u> , <u>R650G</u>	<i>E. faecium</i>
EYKKCDVASKELYNKQLEIG	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>E37K</u> , <u>N122K</u> , <u>Y135C</u> , <u>Y176D</u> , <u>A350V</u> , <u>V395A</u> , <u>A396S</u> , <u>Q509K</u> , <u>Q541E</u> , <u>M552L</u> , <u>N560Y</u> , <u>K562N</u> , <u>Q565K</u> , <u>E614Q</u> , <u>I627L</u> , <u>D633E</u> , <u>N640I</u> , <u>R650G</u>	<i>E. faecalis</i>
EYKWDVKELYNKQLEIG	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>N122K</u> , <u>Y135W</u> , <u>Y176D</u> , <u>A350V</u> , <u>Q509K</u> , <u>Q541E</u> , <u>M552L</u> , <u>N560Y</u> , <u>K562N</u> , <u>Q565K</u> , <u>E614Q</u> , <u>I627L</u> , <u>D633E</u> , <u>N640I</u> , <u>R650G</u>	<i>E. faecium</i>
EYKWDVDASKELYNKQLEIG (OprA _{E35048})	<u>K3E</u> , <u>N12Y</u> , <u>N122K</u> , <u>Y135W</u> , <u>Y176D</u> , <u>A350V</u> , <u>G393D</u> , <u>V395A</u> , <u>A396S</u> , <u>Q509K</u> , <u>Q541E</u> , <u>M552L</u> , <u>N560Y</u> , <u>K562N</u> , <u>Q565K</u> , <u>E614Q</u> , <u>I627L</u> , <u>D633E</u> , <u>N640I</u> , <u>R650G</u>	<i>E. faecium</i>

H	Q219 <u>H</u>	<i>E. faecalis</i>
I	T572 <u>I</u>	<i>E. faecalis</i>
K	I287 <u>K</u>	<i>S. suis</i>
KD	T112 <u>K</u> , Y176 <u>D</u>	<i>E. faecalis</i> <i>S. suis</i>
KDP	T112 <u>K</u> , Y176 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>E. faecalis</i>
KDTP	T112 <u>K</u> , Y176 <u>D</u> , P179 <u>I</u> , T481 <u>P</u>	<i>E. faecalis</i>
KLDP	T112 <u>K</u> , S147 <u>L</u> , Y176 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>E. faecium</i>
KDDGP	T112 <u>K</u> , Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u> , S411 <u>G</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
KDKGP	T112 <u>K</u> , Y176 <u>D</u> , E290 <u>K</u> , S411 <u>G</u> , T481 <u>P</u>	<i>Fusobacterium sp.</i>
P	T481 <u>P</u>	<i>C. perfringens</i> <i>C. coli</i>
RD	I104 <u>R</u> , Y176 <u>D</u>	<i>S. suis</i> <i>E. faecalis</i>
RDK	I104 <u>R</u> , Y176 <u>D</u> , E256 <u>K</u>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>S. suis</i>
RDKP	I104 <u>R</u> , Y176 <u>D</u> , E256 <u>K</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
RDKGP	I104 <u>R</u> , Y176 <u>D</u> , E256 <u>K</u> , S411 <u>G</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. suis</i>
SDDP	A27 <u>S</u> , G40 <u>D</u> , G393 <u>D</u> , T481 <u>P</u>	<i>S. gallolyticus subsp. pasteurianus S.</i>
T	A13 <u>T</u>	<i>suis</i>
YDD	N12 <u>Y</u> , Y176 <u>D</u> , G393 <u>D</u>	<i>S. sciuri</i>

^a Le sostituzioni amminoacidiche sono mostrate in grassetto e sottolineate; il trattino nella variante D_2 indica che il rispettivo amminoacido è deletato.

1.2.10. Il gene *poxxA*

Il meccanismo di resistenza agli oxazolidinoni più recente è codificato dal gene *poxxA* (*phenicols*, *oxazolidinones* e *tetracyclines*) identificato per la prima volta nel 2018 in un MRSA linezolid-resistente isolato da un paziente con fibrosi cistica (Antonelli *et al.*, 2018) e codificante per una proteina di protezione ribosomiale appartenente alla famiglia delle ABC-F. Dall'analisi BLASTP è emerso che la proteina PoxxA mostrava un'identità amminoacidica del 32% con la proteina OptrA. L'espressione del gene in diversi background genetici (*E. coli*, *S. aureus* ed *E. faecalis*) ha mostrato che *poxxA* era in grado di ridurre la sensibilità ai fenicoli (cloramfenicolo

e florfenicolo), agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid) e alle tetracicline (tetraciclina e doxyciclina) (Antonelli *et al.*, 2018).

Lo studio del genoma di *S. aureus* AOUC-0915 ha rivelato che *poxtA*, era localizzato in un trasposone enterococcico composto di 48 kb, denominato Tn6349, inserito in un gene codificante una ATPasi del profago ϕ N315-like trovato nel cromosoma di MRSA AOUC-0915. Il trasposone Tn6349, delimitato da due sequenze di inserzione IS1216, veicolava altri due nuovi trasposoni di più piccole dimensioni: (i) il Tn6657, portante i geni di resistenza *poxtA* e *fexB*; (ii) il Tn6644 recante il gene *cfr* e in grado di formare dei *minicircle* (D'Andrea *et al.*, 2019) (Figura 24).

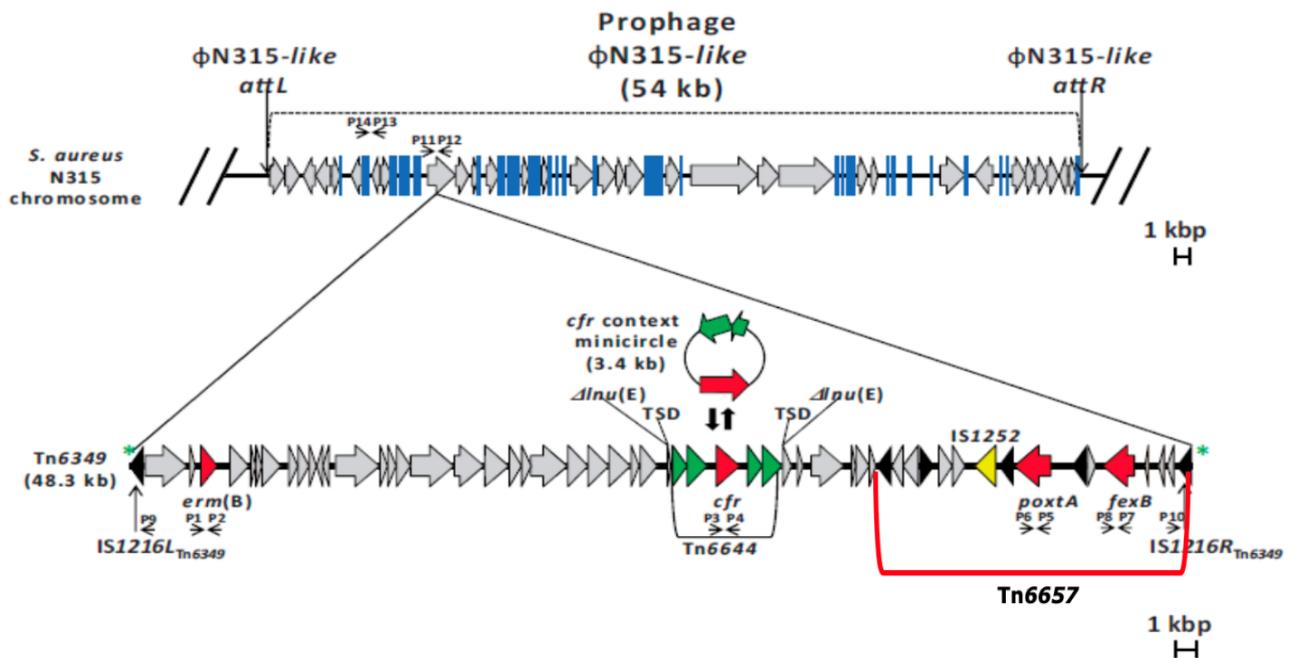


Figura 24. Rappresentazione dell'ambiente genetico (sezione superiore) e struttura (sezione inferiore) del trasposone Tn6349, inserito nel cromosoma di *S. aureus* AOUC-0915. Le due copie di IS1216 che delimitano Tn6349 sono indicate rispettivamente come IS1216L_{Tn6349} e IS1216R_{Tn6349}. Gli asterischi 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 (ISEnfa5). I geni di resistenza *erm(B)*, *cfr*, *poxtA* e *fexB* sono indicati in rosso. Il trasposone Tn6657 è evidenziato da un semi-rettangolo rosso.

Tn6349, risulta fiancheggiato da una piccola sequenza diretta e ripetuta di 8 bp (5'-AAACAAAT-3'), coinvolta nel meccanismo di duplicazione e trasposizione dell'elemento genetico.

La struttura a mosaico di Tn6349 ha suggerito che questo elemento abbia avuto origine dalla ricombinazione tra un plasmide enterococcico (pRE25-like) e il trasposone composito Tn6657, seguito dalla co-integrazione nel profago.

Una più accurata analisi di sequenza ha definito in dettaglio la regione contenente *poxtA*: il gene è fiancheggiato da due IS1216 (denominate IS1216_U ed IS1216_D), con lo stesso orientamento. L'IRL di IS1216_D, localizzata all'estremità 3' del gene, è parte della regione codificante, mentre, l'IRR è interrotta dall'inserimento a valle di una IS1252-like, suggerendo che l'inserimento di questa IS si sia verificato successivamente alla mobilizzazione di *poxtA* (Figura 25). Successivi saggi di PCR inversa hanno mostrato che il contesto è instabile e in grado di formare piccole unità traslocabili responsabili della diffusione di *poxtA*.

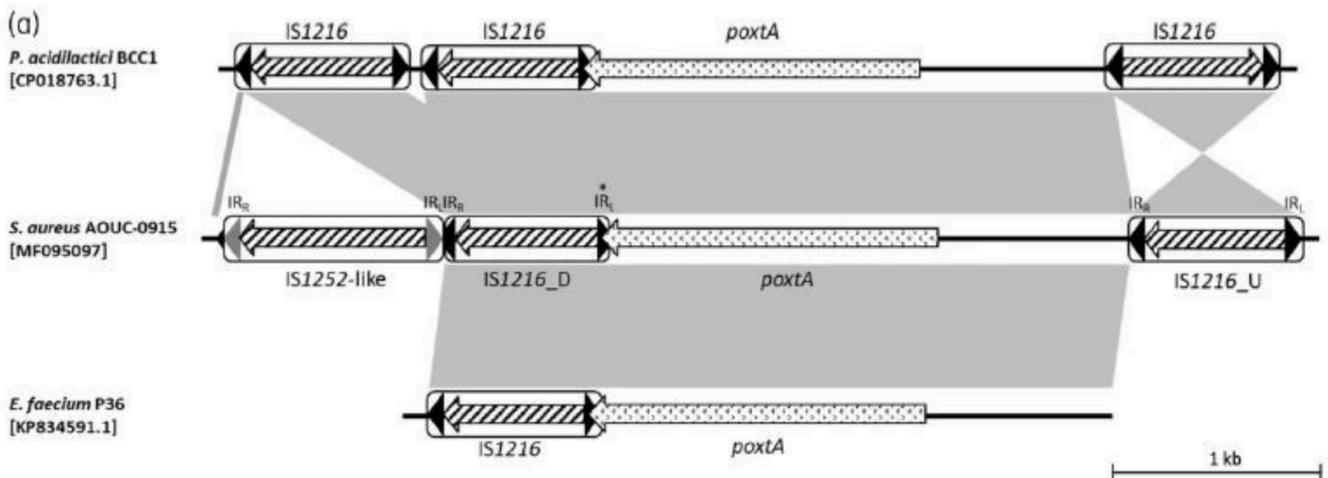


Figura 25. Confronto dei contesti genetici di *poxtA* in *P. acidilactici* BCC1, in *E. faecium* P36 e in *S. aureus* AOUC-0915. Le regioni con identità nucleotidica > 99% sono connesse da aree grigie.

Dallo stesso studio è emerso che *poxtA* era presente anche in altri batteri Gram-positivi quali *Enterococcus spp.* e *Pediococcus acidilactici*, per lo più di origine

animale; ciò ha suggerito che la selezione del gene possa essere avvenuta negli allevamenti a causa dell'ampio uso di fenicoli in medicina veterinaria (Antonelli *et al.*, 2018). Sulla base di questo dato, nel 2019, Brenciani *et al.* hanno identificato il primo ceppo di *E. faecium* linezolid-resistente, proveniente da un allevamento intensivo suinicolo del centro Italia, contenente il gene *poxtA*. Il determinante, localizzato su due plasmidi coniugativi rispettivamente di circa 30 kb e 97 kb, era in grado di conferire resistenza al linezolid anche in assenza di altri meccanismi di resistenza conosciuti (Brenciani *et al.*, 2019).

A differenza delle proteine OptrA e Cfr(C), la sequenza amminoacidica di PoxtA sembra essere altamente conservata. Tuttavia, molto recentemente è stata scoperta una nuova variante allelica del gene denominata *poxtA2*. Descritta per la prima volta in un ceppo di *E. gallinarum* umano boliviano (Baccani *et al.*, 2021) questa variante è stata poi identificata in ceppi di *E. faecalis* isolati da alimenti e da cavità nasale in Corea (Jung *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021) ed in *E. faecalis* e *E. casseliflavus* isolati da letame e da feci suine in Italia (Cinthy *et al.*, 2022).

Il gene *poxtA2*, a differenza di *poxtA* trovato in *S. aureus* AOUC-0915, non presentava l'inserzione di una IS1216 in corrispondenza dell'estremità 3' (Figura 26). Pertanto, la proteina PoxtA2 differiva da quella *wild-type* per la presenza di otto amminoacidi diversi (TPEEEQKY) all'estremità carbossi-terminale (Baccani *et al.*, 2021).

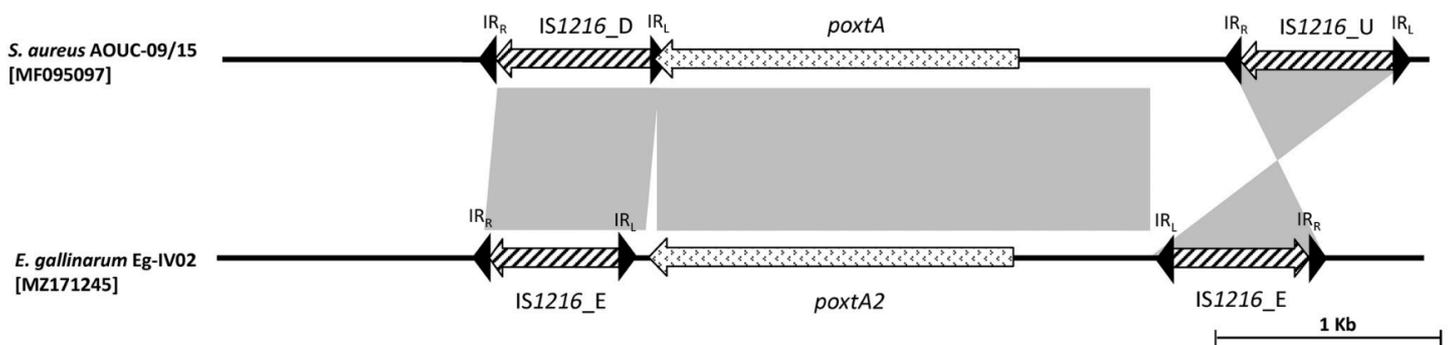


Figura 26. Confronto del contesto genetico di *poxtA* nel cromosoma di *S. aureus* AOUC-0915 e nel plasmide piB-BOL di *E. gallinarum* Eg-IV02. Le regioni con identità nucleotidica >99% sono evidenziate

da zone grigie; i geni che codificano per la trasposasi sono indicati da frecce a strisce e le *Inverted Repeat* (IR) sono indicate da triangoli neri.

Il *Whole genome sequencing* di *E. gallinarum* Eg-IV02 ha mostrato che *poxtA2* risultava essere localizzato nel plasmide pIB-BOL di 13.7kb (Figura 27).

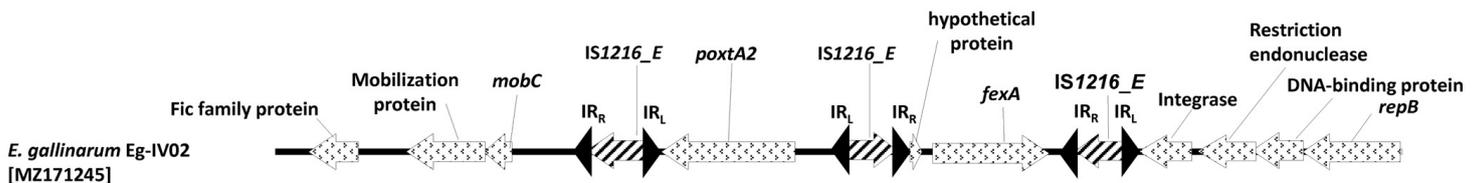


Figura 27. Mappa del plasmide pIB-BOL di *E. gallinarum* Eg-IV02.

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che *poxtA2* probabilmente rappresenta un presunto antenato di *poxtA* generato da un evento di ricombinazione diverso da quello precedentemente osservato per il gene *wild-type* (Baccani *et al.*, 2021).

Come precedentemente descritto per altri determinanti di resistenza agli oxazolidinoni, anche *poxtA* mostra una localizzazione prevalentemente plasmidica (Elghaieb *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019; Egan *et al.*, 2020). In tutti i contesti genetici analizzati, *poxtA* risulta essere sempre fiancheggiato da elementi IS1216 che sembrano essere responsabili della disseminazione e della persistenza del gene *poxtA* nella popolazione enterococcica (Shan *et al.*, 2020).

Gli stessi autori hanno anche mostrato come plasmidi mobilizzabili contenenti il gene *poxtA* possano trasferirsi grazie all'aiuto di plasmidi coniugativi *helper* sia mediante ricombinazione omologa (*E. faecalis*) che attraverso una trasposizione replicativa (*Enterococcus lactis*) (Shan *et al.*, 2022). A conferma di ciò Xu *et al.* hanno osservato che, durante il processo di coniugazione, plasmidi *poxtA*-positivi possono subire fenomeni di ricombinazione che portano alla formazione di strutture a mosaico che differiscono da quelli degli isolati parentali (Xu *et al.*, 2022).

Il gene *poxA* è attualmente rilevato in undici paesi di quattro continenti, nella maggior parte dei quali sono stati identificati anche batteri positivi per *cfr* e/o *optrA* (Figura 28) e identificato in batteri appartenenti ai generi *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* di origine umana, animale ed ambientale (Brenciani *et al.*, 2022).

È interessante notare che Ultime sorveglianze sulla prevalenza del gene *poxA* tra enterococchi clinici, animali o ambientali resistenti a linezolid, raccolti in diversi paesi, hanno evidenziato che questo gene è il meccanismo di resistenza agli oxazolidinone più diffuso in *E. faecium* indipendentemente dalla presenza del gene *optrA* e delle alterazioni dell'rRNA 23S.

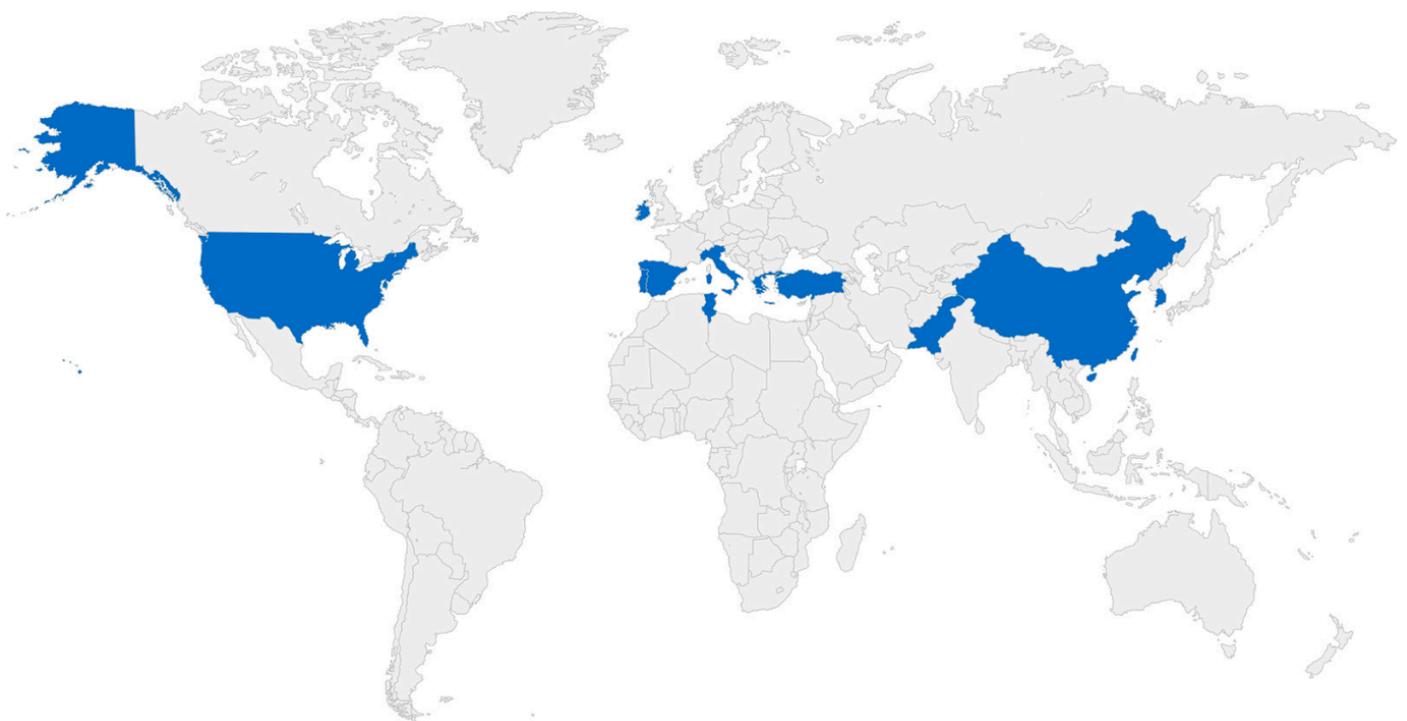


Figura 28. Distribuzione geografica dei batteri portatori di *poxA*. I paesi in blu sono quelli in cui è stata segnalata la presenza di batteri portatori del gene di resistenza.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Siti di campionamento ed isolamento di enterococchi florfenicol-resistenti

Nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzato al monitoraggio di antibiotico-resistenze in batteri di origine marina, sono state condotte attività di campionamento tra luglio e settembre del 2019 in undici siti differenti di due aree costiere italiane, una localizzata ad ovest, nel Mar Ligure, e l'altra situata ad est, nel Mar Adriatico. I siti di campionamento nel Mar Ligure erano tre: Sito 1 (Genova Fronte), Sito 2 (Genova Nord) e Sito 3 (Genova Sud), localizzati a tre profondità diverse e posizionati di fronte al porto e all'ospedale della città di Genova. I siti di campionamento nel Mar Adriatico invece, erano otto, tre localizzati di fronte un'area urbana vicino l'estuario del fiume Esino e ad una raffineria (Esino Nord, Esino Sud, ed Esino Fronte), tre di fronte l'ospedale di Torrette, Ancona (Torrette Largo, Torrette Sud e Torrette Fronte) e due davanti il porto della città di Ancona (Porto 1 e Porto 2) (Figura 29).



Figura 29. Mappa complessiva delle due aree di campionamento situate nel Mar Ligure e nel Mar Adriatico. Le coordinate geografiche e la profondità dei siti di campionamento sono i seguenti: GEN, 44°23925.260N, 8°56940.560E, 13.4 m; GES, 44°23922.060N, 8°56944.590E, 16.1 m; GEF, 44°23921.480N, 8°56939.770E, 16.2 m. EN, 43°38951.060N, 13°2296.660E, 4 m; EF, 43°38941.160N, 13°22922.740E, 3 m; ES, 43°38937.200N, 13°22941.460E, 3.4 m. TF, 43°36945.960N, 13°27912.360E, 3 m; TS, 43°36940.020N, 13°27922.080E, 2.4 m; TN, 43°37917.940N, 13°27926.640E, 7.6 m. PN, 43°37921.300N, 13°2992.100E, 8.8 m; PS, 43°37922.780N, 13°29926.160E, 7 m.

In ogni sito, sono stati prelevati setti campioni di cui tre da acqua marina, tre da sedimento e uno da zooplancton.

Sono stati ottenuti 77 campioni successivamente incubati *overnight* alla temperatura di 37°C in brodo azide (*Oxoid*, Basingstoke, UK) per l'arricchimento selettivo di enterococchi. Cinque grammi di ciascun campione da sedimento sono stati immediatamente aggiunti al brodo di arricchimento, mentre i campioni provenienti da acqua e zooplancton sono stati trattati come segue. Quattrocento millilitri di ogni campione d'acqua sono stati filtrati attraverso filtri da 0,22 µm

(Merck Life Science, Milano, Italia) e incubati in trenta millilitri di brodo azide. Per quanto riguarda gli organismi zooplanctonici, aliquote da cinquanta millilitri, sono stati raccolti trascinando l'acqua orizzontalmente a circa un metro di profondità con una rete per plancton con maglia da 200 μm . Le aliquote zooplanctoniche raccolte sono state centrifugate per 10 minuti a 15,000 x g; il pellet è stato risospeso in 5 ml di acqua di mare sterile artificiale e aggiunto a 40 ml di brodo azide. Successivamente da ogni coltura di arricchimento sono stati prelevati 100 μL e seminati su piastre di *Slanetz-Bartley* agar (Liofilchem, Roseto degli abruzzi, Italia) contenenti florfenicolo 10 mg/L per la selezione di isolati enterococcici resistenti. Da ogni piastra selettiva che mostrava crescita batterica, otto colonie di presunti enterococchi resistenti sono state selezionate arbitrariamente per analisi successive. L'identificazione dei ceppi che trasportano geni di resistenza agli oxazolidinoni è stata eseguita mediante MALDI-TOF (Vitek-MS, bioMérieux).

2.2. Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale dei campioni batterici è stata eseguita mediante l'utilizzo del kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germania). I campioni provenienti da coltura pura erano dapprima inoculati in *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) e incubati overnight a 37°C; le brodoculture così ottenute erano centrifugate a 12000 g per 2 minuti, il pellet risospeso in 200 μL di *Lysozyme Solution* contenente lisozima (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germania) alla concentrazione finale di 20 mg/mL e incubate a 37°C per 1 ora. Al termine dell'incubazione, seguiva la digestione delle proteine mediante 200 μL di *Lysis Solution C* e 20 μL di Proteinasi K (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germania); per rendere efficace la digestione, i campioni venivano mantenuti a 55°C per 10 minuti. Alla sospensione, erano poi aggiunti 200 μL di etanolo assoluto che veniva mescolato invertendo più volte i campioni. A questo punto si trasferiva tutta la

soluzione nelle colonnine fornite dal kit precedentemente attivate. Dopo una centrifugazione a 6500 g per 1 minuto, si eliminava l'eluito e si procedeva con 2 lavaggi con 500 µL di *Wash Solution*. Una volta trasferite le colonnine in nuove eppendorf, per recuperare il DNA purificato, si aggiungevano 200 µL di *Elution Solution* e si centrifugava a 6500 g per 1 minuto. I campioni venivano così conservati a -20°C.

2.3. Caratterizzazione genotipica

Gli enterococchi florfenicolo–resistenti selezionati sono stati analizzati mediante saggi di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per la presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni: *optrA*, *cfr* e *poxtA* utilizzando le coppie di primer riportate in Tabella 5 (Brenciani *et al.*, 2019). I ceppi *S. aureus* AOUC-0915 (Antonelli *et al.*, 2016) ed *E. faecium* E35048 (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) e risolti mediante 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). I prodotti di PCR sono stati sottoposti anche a sequenziamento Sanger.

Gli isolati positivi ad almeno uno dei tre determinanti di linezolid 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 5. Coppie di primers utilizzate in questo studio

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')	Dimensione amplicon (bp)
<i>cfr</i>	cfr-FW cfr-RV	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	746
<i>optrA</i>	optrA New-FW optrA New-RV	GCTGATAGATAAAATGGAGAAT TGAGCAAGCTGTTGGTCAAAAT	879
<i>poxA</i>	poxA-FW poxA-RV	GAACGCTTGGAGTATTTGACTTC CTGGACTGAGAATACCCATC	778

2.4. Antibiotici

Gli antibiotici, acquistati sottoforma di polveri (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), sono stati risospesi mediante opportuni solventi (linezolid, tetraciclina e vancomicina 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 Strips* per il tedizolid sono state fornite dalla ditta Liofilchem (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) e conservate a 4°C.

2.5. Test di sensibilità

I test di sensibilità sono stati eseguiti mediante microdiluizione in brodo in accordo con la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). 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. Parallelamente, sono stati eseguiti gli *E-test* (test epilsometrico) per saggiare la sensibilità tedizolid. Questo test prevedeva inoculi

standardizzati a concentrazioni di 1×10^8 CFU/ml e 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* forniti da CLSI (documento CLSI M100-Ed32) ed EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility*); *E. faecalis* ATCC 29212 è stato utilizzato come ceppo di controllo (Tabelle EUCAST Quality Control v13.0) (<http://www.eucast.org>) (Tabella 6).

Tabella 6. Breakpoints suggeriti dal CLSI relativi agli antibiotici saggiati in questo studio.

Breakpoints <i>Enterococcus</i> spp (mg/L)			
	Sensibile	Intermedio	Resistente
<i>Florfenicolo</i>	N.D.*	N.D.*	N.D.*
<i>Cloramfenicolo</i>	≤ 8	16	≥ 32
<i>Linezolid</i>	≤ 2	4	≥ 8
<i>Tedizolid</i>	≤ 0,5	-	-
<i>Tetraciclina</i>	≤ 4	8	≥ 16
<i>Vancomicina</i>	≤ 4	8 – 16	≥ 32

*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 brodoculture 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 formazione delle plugs. Queste venivano lasciate solidificare e in seguito incubate a 37°C per 24 ore aggiungendo 5 ml di tampone di lisi contenente: lisozima in quantità pari a 1 mg/mL e RNasi A in quantità di 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*. A questo punto metà plug veniva incubata overnight utilizzando 30 U dell'enzima di restrizione *SmaI* (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 differenze 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, 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. Intermedi circolari

Per valutare la capacità di escissione dei contesti genetici dei determinanti di resistenza al linezolid, sono stati eseguiti esperimenti di PCR utilizzando specifiche coppie di primer dirette verso l'esterno dei geni di resistenza al linezolid (Tabella 7). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando la *ExTaq polymerase* (TaKara Bio, Shiga, Japan). Gli amplificati, una volta risolti mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio, erano visualizzati al transilluminatore ad una lunghezza d'onda di 260 nm; il marker utilizzato era il *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Tabella 7. Coppie di primer usate per lo studio delle forme circolari.

Gene	Primer	Sequenza (5'-3')
<i>optrA</i>	optrAdiv-FW	GAAAAATAACACAGTAAAAGGC
	optrAdiv-RV	TTTTTCCACATCCATTTCTACC
<i>poxA</i>	poxAdiv-FW	GACGAGCCGACCAACCACT
	poxAdiv-RV	TTCAGGCGGACAAAAATCCAA

2.8. Saggi di trasferibilità mediante coniugazione

Al fine di saggiare la mobilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni sono stati condotti esperimenti di coniugazione *in vitro* utilizzando come donatori tutti gli enterococchi risultati positivi ad almeno un gene di resistenza; come ricevente è stato usato *E. faecium* 64/3, sensibile a linezolid (MIC \leq 2 mg/L) e florfenicolo (MIC \leq 4 mg/L) e resistente a rifampicina e acido fusidico (MIC, $>$ 10 mg/L). Donatore e ricevente, venivano fatti crescere in BHI brodo fino al raggiungimento di una OD₆₇₅ pari a 0,4 e poi filtrati utilizzando filtri di nitrocellulosa da 0,22 μ m (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) in rapporto 1:1. Prelevato il filtro sterilmente dall'apparato di filtrazione, veniva posizionato al centro di una piastra preriscaldata di BHI agar e

incubato *overnight* a 37°C. In seguito, per rimuovere i batteri adesi sul filtro, questo veniva lavato con 10 mL di soluzione fisiologica sterile e la sospensione batterica veniva centrifugata a 8000 g per 10 minuti; il pellet ottenuto veniva risospeso in 1 mL di soluzione fisiologica sterile. Si procedeva effettuando diluizioni scalari fino a raggiungere la diluizione 10⁻¹². Su piastre selettive di BH agar utilizzate per la conta delle CFU/mL di donatori e riceventi, erano inoculati 10 µL di tutte le diluizioni effettuate. La selezione dei transconiuganti, invece, era eseguita mediante spatolamento di 100 µL di sospensione batterica (dall'intero fino alla diluizione 10⁻⁵) su piastre di BH agar contenenti florfenicolo (10 mg/L), acido fusidico (25 mg/L) e rifampicina (25 mg/L). Dopo 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 e linezolid.

2.9. Southern blotting ed ibridazione

Per valutare 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 carica positivamente (Zeta-Probe, Bio-Rad). Successivamente, allo scopo di fissare il DNA alla membrana, questa veniva irradiata con raggi UV (260 nm) per 20 secondi circa e in seguito pre-ibridata per 2 ore a 67°C nel tampone *Ultrahyb* (Ultrasensitive Hybridization Buffer) (Applied Biosystems, Foster City, USA). Trascorso questo tempo, venivano aggiunte le sonde marcate con biotina, preventivamente denaturate a 100°C per 10 minuti; quindi, si procedeva ad

una incubazione *overnight* alla temperatura specifica di ibridazione in leggera agitazione.

Le sonde utilizzate, erano ottenute partendo da amplificati di PCR ottenuti da ceppi positivi per geni di resistenza agli oxazolidinoni. 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 30. La rilevazione del segnale, fase successiva ai lavaggi, avveniva conformemente a quanto indicato nel kit di marcatura. 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).

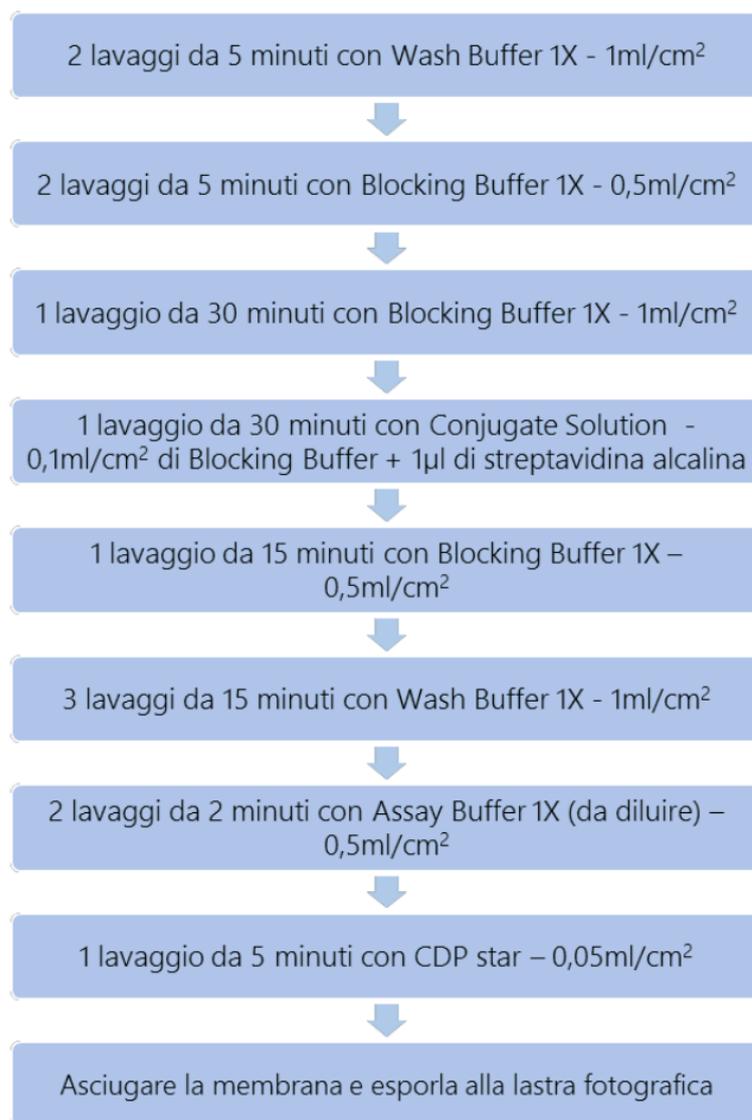


Figura 30. Successione dei lavaggi della membrana per la rilevazione della sonda specifica marcata con biotina.

2.10. Sequenziamento ed analisi di sequenza

Il sequenziamento degli amplificati di PCR è stato eseguito 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 invece è stato ottenuto mediante *Next Generation Sequencing* sfruttando la tecnologia *Illumina Miseq* (MicrobesNG, Birmingham, UK) con *reads* 2x250bp e l'approccio di sequenziamento a *long-reads* della piattaforma *Nanopore (MinION)*, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). L'assemblaggio delle *reads* è stato eseguito tramite il software *SPAdes* v3.11.1 (<http://cab.spbu.ru/software/spades>) e le *open reading frames* (ORFs) più grandi di 50 aminoacidi, sono state annotate con i tool on-line *RAST* (<http://rast.nmpdr.org>) and *ORFfinder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>). La qualità dei contigs finali è stata migliorata utilizzando il software *Burrows- Wheeler Aligner*. 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 *tools* disponibili presso il sito *Center for Genomic Epidemiology* <http://www.genomicepidemiology.org/> (MLST v.2.0, ResFinder v.3.2, LRE-finder v.1.0).

2.11. Numeri d'accesso

I genomi degli isolati sono pubblicamente disponibili tramite il *BioProject* con numero di accesso PRJNA679166. Le sequenze dei singoli plasmidi sono state depositate nel database *GenBank* con i seguenti numeri di accesso: MT683614, MT683615, e MT683616.

3 RISULTATI

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

Dei 77 campioni (33 da acqua di mare, 33 da sedimento, e 11 da zooplancton) raccolti da sei diversi siti di campionamento [GEN, GES, TF, EN, ES e EF (Figura 29)] solo 10 da sedimento e uno da zooplancton erano positivi per la presenza di enterococchi florfenicolo-resistenti.

La ricerca di determinanti di resistenza agli oxazolidinoni (*cfr*, *optrA* e *poxtA*), effettuata mediante saggi di PCR, mostrava che 35 isolati risultavano essere positivi per la presenza di *poxtA* o *optrA*. Di questi campioni tuttavia, solamente sei, rappresentativi di sei diversi pulsotipi (uno per ogni sito) (vedi paragrafo successivo), sono stati caratterizzati: un ceppo di *E. faecalis* e tre ceppi di *E. faecium* isolati da sedimento, e due ceppi di *E. hirae* di cui uno isolato da zooplancton (Tabella 8).

Il gene *optrA* è stato trovato solo in *E. faecalis*, mentre *poxtA* è stato identificato nei restanti isolati; il determinante di resistenza *cfr* non è stato ritrovato in nessuno degli enterococchi testati (Tabella 8).

Dall'analisi fenotipica, i sei isolati enterococcici erano tutti resistenti al florfenicolo con MIC comprese fra 32 a 128 mg/L, al cloramfenicolo con valori di MIC compresi tra 16 e 128 mg/L, e alla tetraciclina (MIC, *range* da 128 - > 128 mg/L). I campioni hanno mostrato sensibilità o resistenza al (MIC range da 2 a 8 mg/L) e tedizolid (MIC range da 2 a 4 mg/L). Tutti i ceppi testati erano sensibili alla vancomicina con valori di MIC compresi tra 0,5 e 1 mg/L (Tabella 8).

Tabella 8. Geni di resistenza agli oxazolidinoni e profili di suscettibilità antimicrobica

Ceppo	Specie	Matrice e sito campionamento ^b	Determinanti resistenza			MIC (mg/L) ^a					
			<i>cfr</i>	<i>optrA</i>	<i>poxtA</i>	FFC	CHL	LZD	TZD	TE	VAN
EN3	<i>E. faecalis</i>	Sedimento	-	+	-	128	128	4	4	128	1
EF3	<i>E. faecium</i>	Sedimento	-	-	+	64	16	8	2	128	1
ES2	<i>E. faecium</i>	Sedimento	-	-	+	32	16	8	2	128	1
TF3	<i>E. faecium</i>	Sedimento	-	-	+	64	32	2	2	> 128	0,5
GE5	<i>E. hirae</i>	Sedimento	-	-	+	64	64	4	2	128	0,5
GE2	<i>E. hirae</i>	Zooplancton	-	-	+	64	64	8	3	128	0,5

^aFFC, florfenicolo; CHL, cloramfenicolo; LZD, linezolid; TZD, tedizolid; TE, tetraciclina; VAN, vancomicina.

^bEN, Esino nord; EF, Esino fronte; ES, Esino sud; TF, Torrette fronte; GEN, Genova nord o Sito 1 Punta Vagno; GES, Genova sud o Sito 2 Punta Vagno.

3.2. Tipizzazione degli isolati enterococcici

Tutti e sei gli isolati sono stati sottoposti a tipizzazione mediante *SmaI*-PFGE. I pulsotipi ottenuti sono stati confrontati tenendo conto del numero e della dimensione delle bande sul gel. Sono stati identificati tre diversi pulsotipi (da A a C) e due sottotipi (A1 e C1) (Tabella 9) (Figura 31). È stato osservato che *E. faecium* EF3 ed *E. faecium* ES2 sono strettamente correlati (C e C1 rispettivamente), così come *E. hirae* GE5 (sedimento) ed *E. hirae* GE2 (zooplancton) (A1 e A rispettivamente) (Tabella 9) (Figura 31).

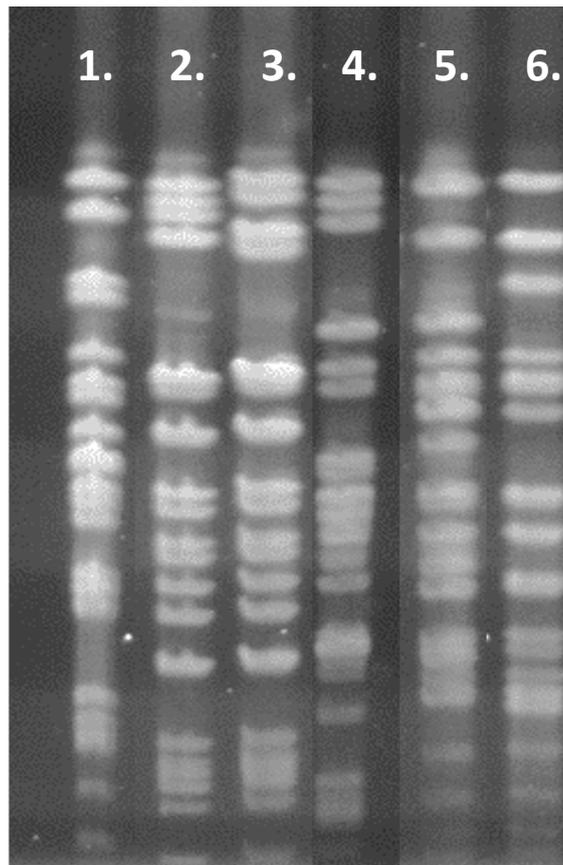


Figura 31. *SmaI*-PFGE dei sei isolati enterococcici. 1, *E. faecalis* EN3; 2, *E. faecium* EF3; 3, *E. faecium* ES2; 4, *E. faecium* TF3; 5, *E. hirae* GE5; 6, *E. hirae* GE2.

Successivamente l'analisi MLST (*Multilocus Sequence Type*) ha evidenziato la presenza di tre *Sequence Type* (ST): ST585, ST1710 e ST1711. *E. faecalis* EN3 apparteneva all'ST585 associato a enterococchi di origine umana; *E. faecium* EF3 ed ES2 appartenevano alla stessa linea clonale (ST1710), mentre *E. faecium* TF3 apparteneva all' ST1711. Per i due isolati di *E. hirae* non è stato possibile stabilire l'ST. Sebbene entrambe questi ST, ST1710 e ST1711, non siano mai state descritti prima, ST1710 è parte del complesso clonale CC94, che include enterococchi umani, isolati sia in ambito comunitario che ospedaliero. In Tabella 9 sono riassunti i risultati di tipizzazione ottenuti.

3.3. Localizzazione dei determinanti di resistenza agli oxazolidinoni e analisi degli intermedi circolari

Attraverso esperimenti di S1-PFGE e saggi di *Southern-blot* e ibridazione, è stato possibile determinare la localizzazione dei determinanti di resistenza agli oxazolidinoni negli isolati oggetto di questo studio. In *E. faecalis* EN3, la sonda *optrA* ibridizzava su due plasmidi, uno di 20 kb e l'altro di 140 kb (Figura 32).

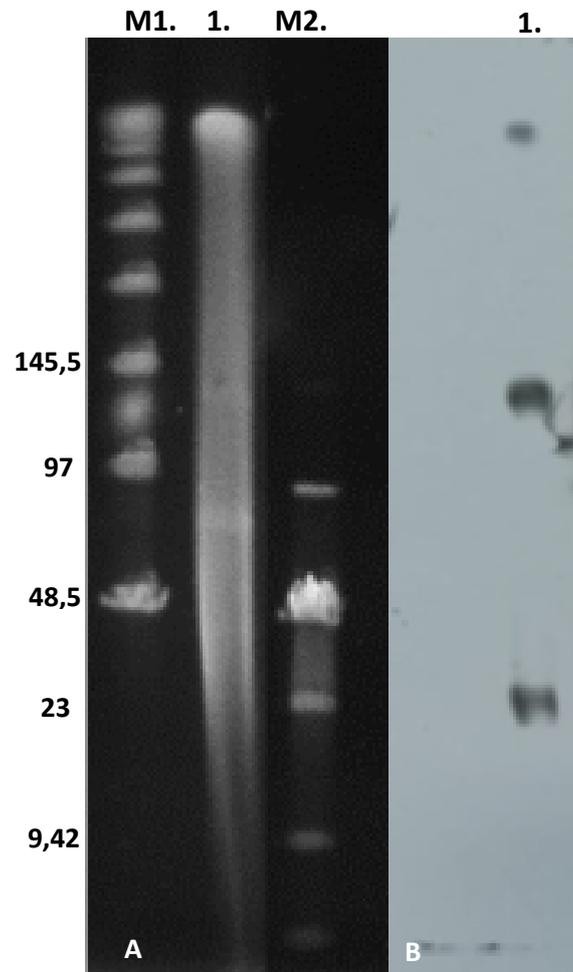


Figura 32. S1-PFGE (A) e ibridazione per *E. faecalis* EN3 con la sonda per il gene *optrA* (B). M1, marker Lambda (Promega, Madison, USA); 1, *E. faecalis* EN3; M2, marker Low Range (Promega, Madison, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

Nei tre isolati di *E. faecium* positivi per *poxtA*, il gene mostrava una localizzazione sia cromosomica che plasmidica. La sonda *poxtA* ibridizzava su plasmidi di differenti dimensioni: (i) 30 kb in *E. faecium* EF3; (ii) 15 kb e 30 kb in *E. faecium* ES2; (iii) 30 kb, 50kb e 80 kb in *E. faecium* TF3 (Figura 33).

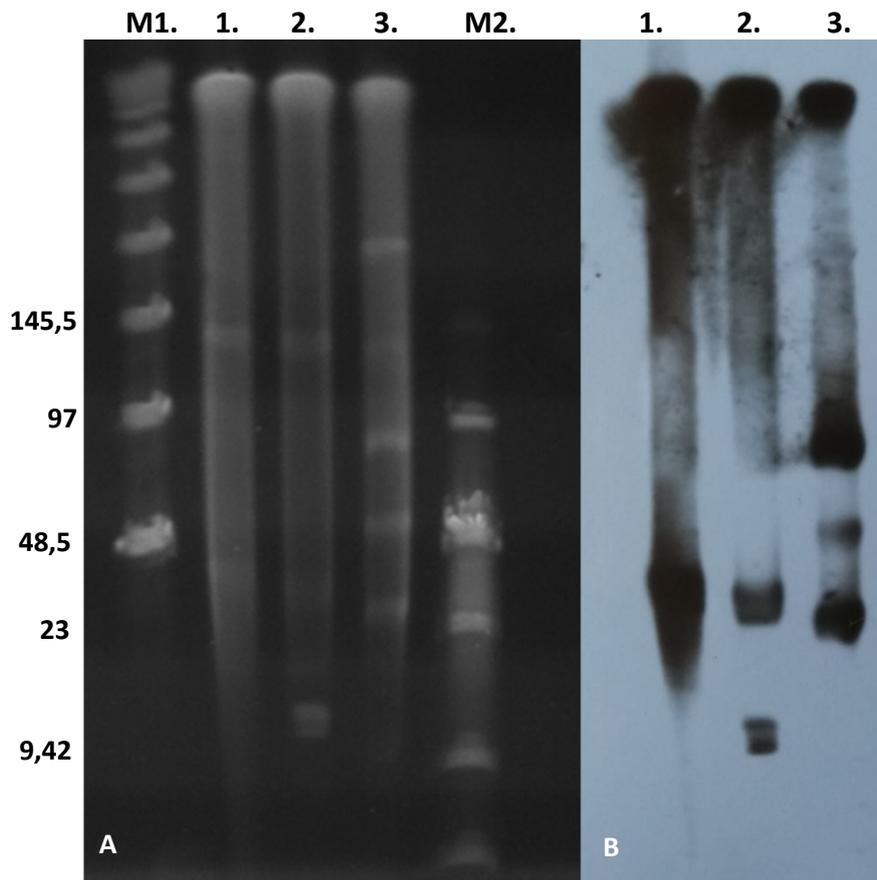


Figura 33. S1-PFGE (A) e ibridazione per i tre ceppi di *E. faecium* con la sonda per il gene *poxA* (B). M1, marker Lambda (Promega, Madison, USA); 1, *E. faecium* EF3; 2, *E. faecium* ES2; 3, *E. faecium* TF3; M2, marker Low Range (Promega, Madison, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

Nei due isolati di *E. hirae* GE5 e GE2, la sonda *poxA* ibridizzava solo a livello plasmidico: un plasmide da 25 kb e uno da 100kb (Figura 34).

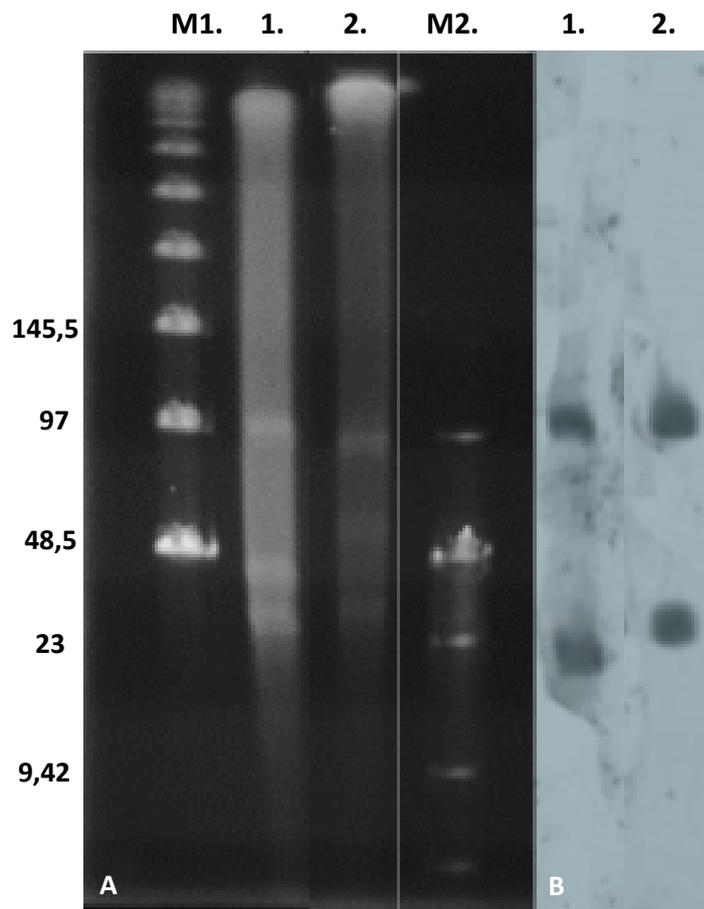


Figura 34. S1-PFGE (A) e ibridazione per i due isolati di *E. hirae* con la sonda per il gene *poxxA* (B). M1, marker Lambda (Promega, Madison, USA); 1, *E. hirae* GE2; 2, *E. hirae* GE5; M2, marker Low Range (Promega, Madison, USA). A sinistra sono riportate le dimensioni di alcune bande del marker espresse in kb.

La capacità dei diversi contesti genetici di escindersi in forma circolare è stata valutata mediante esperimenti di PCR inversa.

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

Al contrario, i contesti genetici di *poxxA* sembrano in grado di formare unità traslocabili. In *E. faecium*, l'ibridazione si verifica, infatti, sia su plasmidi di diverse

dimensioni che sul cromosoma. La mobilità intracellulare è favorita dalla presenza di elementi IS funzionali ad eventi di ricombinazione.

In Tabella 9 sono riepilogati i dati di tipizzazione e localizzazione genica.

Tabella 9. Dati di tipizzazione e localizzazione dei determinanti di resistenza

Ceppo	Specie	Risultati di tipizzazione		Dimensione plasmidi (kb) da ibridazione ^a	
		SmaI-PFGE	MLST	<i>optrA</i>	<i>poxtA</i>
EN3	<i>E. faecalis</i>		ST585	20, 140	
EF3	<i>E. faecium</i>	C	ST1710		30, c
ES2	<i>E. faecium</i>	C1	ST1710		15, 30, c
TF3	<i>E. faecium</i>	B	ST1710		30,50, 80, c
GE5	<i>E. hirae</i>	A1	-		25, 100
GE2	<i>E. hirae</i>	A	-		25, 100

^ac, cromosoma

3.4. Trasferibilità dei geni di resistenza agli oxazolidinoni

La trasferibilità dei geni *optrA* e *poxtA* è stata studiata attraverso esperimenti di coniugazione su filtro, impiegando come donatori tutti e sei i campioni florfenicolo-resistenti e come ricevente *E. faecium* 64/3 realizzando in questo modo incroci intraspecifici e interspecifici con gli isolati appartenenti alle specie di enterococchi minori. Cinque campioni su sei si sono dimostrati capaci di trasferire geni di linezolid resistenza nelle condizioni adottate in questo studio. Tutti gli isolati *poxtA*-positivi hanno trasferito il gene al ricevente *E. faecium* 64/3; l'unico isolato *optrA*-positivo nonostante numerosi tentativi, si è dimostrato incapace di trasferire il determinante di resistenza al ricevente.

Le frequenze più elevate sono state osservate nel trasferimento intraspecifico di *poxA* da *E. faecium* ES2 ed *E. faecium* TF3 a *E. faecium* 64/3 (rispettivamente 6.5×10^{-1} e 1.1×10^{-1}).

Per ciascun incrocio è stato selezionato e caratterizzato un transconiugante. In ciascuno di essi, l'acquisizione del gene di resistenza è stata confermata mediante PCR e attraverso la valutazione del fenotipo di resistenza tramite determinazione delle MIC (Tabella 10).

Tabella 10. MIC di florfenicolo e linezolid, genotipo di resistenza e localizzazione genica dei transconiuganti.

Donatore/ Transconiugante	Ricevente	Frequenza trasferimento	Transconiuganti			Localizzazione genica ^c	
			MIC (mg/L) di:		Genotipo	<i>optrA</i>	<i>poxA</i>
			FFC	LZD			
<i>E. faecalis</i> EN3	<i>E. faecium</i> 64/3	ND ^b	128	4	<i>optrA</i>	20, 140	-
<i>E. faecium</i> EF3	<i>E. faecium</i> 64/3	5×10^{-5}	64	8	<i>poxA</i>	-	30, c
TC ^a			64	4	<i>poxA</i>	-	30, c
<i>E. faecium</i> ES2	<i>E. faecium</i> 64/3	6.5×10^{-1}	32	8	<i>poxA</i>	-	15, 30, c
TC			64	4	<i>poxA</i>	-	30, c
<i>E. faecium</i> TF3	<i>E. faecium</i> 64/3	1.1×10^{-1}	64	2	<i>poxA</i>	-	30, 50, 80, c
TC			32	2	<i>poxA</i>	-	30, c
<i>E. hirae</i> GE5	<i>E. faecium</i> 64/3	7.5×10^{-5}	64	4	<i>poxA</i>	-	25, 100
TC			64	4	<i>poxA</i>	-	25, c
<i>E. hirae</i> GE2	<i>E. faecium</i> 64/3	3×10^{-6}	64	8	<i>poxA</i>	-	25, 100
TC			64	4	<i>poxA</i>	-	25, c

^aTC, transconiugante;

^bND, non determinato;

^cC, cromosoma.

In ciascun transconiugante è stata anche valutata la localizzazione del gene *poxA*. Saggi di S1-PFGE, Southern-blotting e ibridazione condotti sui transconiuganti,

hanno evidenziato localizzazioni del gene *poxtA* sia su plasmidi di 25 e 30 kb che sul cromosoma (Tabella 10).

3.5. Analisi WGS

Tutti e sei gli isolati sono stati sottoposti ad analisi mediante WGS che ha permesso di ricostruire e studiare i plasmidi recanti i geni di resistenza agli oxazolidinoni.

Dalle analisi bioinformatiche è emerso che: (i) il gene *optrA* di *E. faecalis* EN3 era parte di un plasmide di 16.500 bp, chiamato pEfs-EN3 con un contenuto in G+C pari al 33,0% (Numero d'accesso GenBank MT683614) (Figura 35).

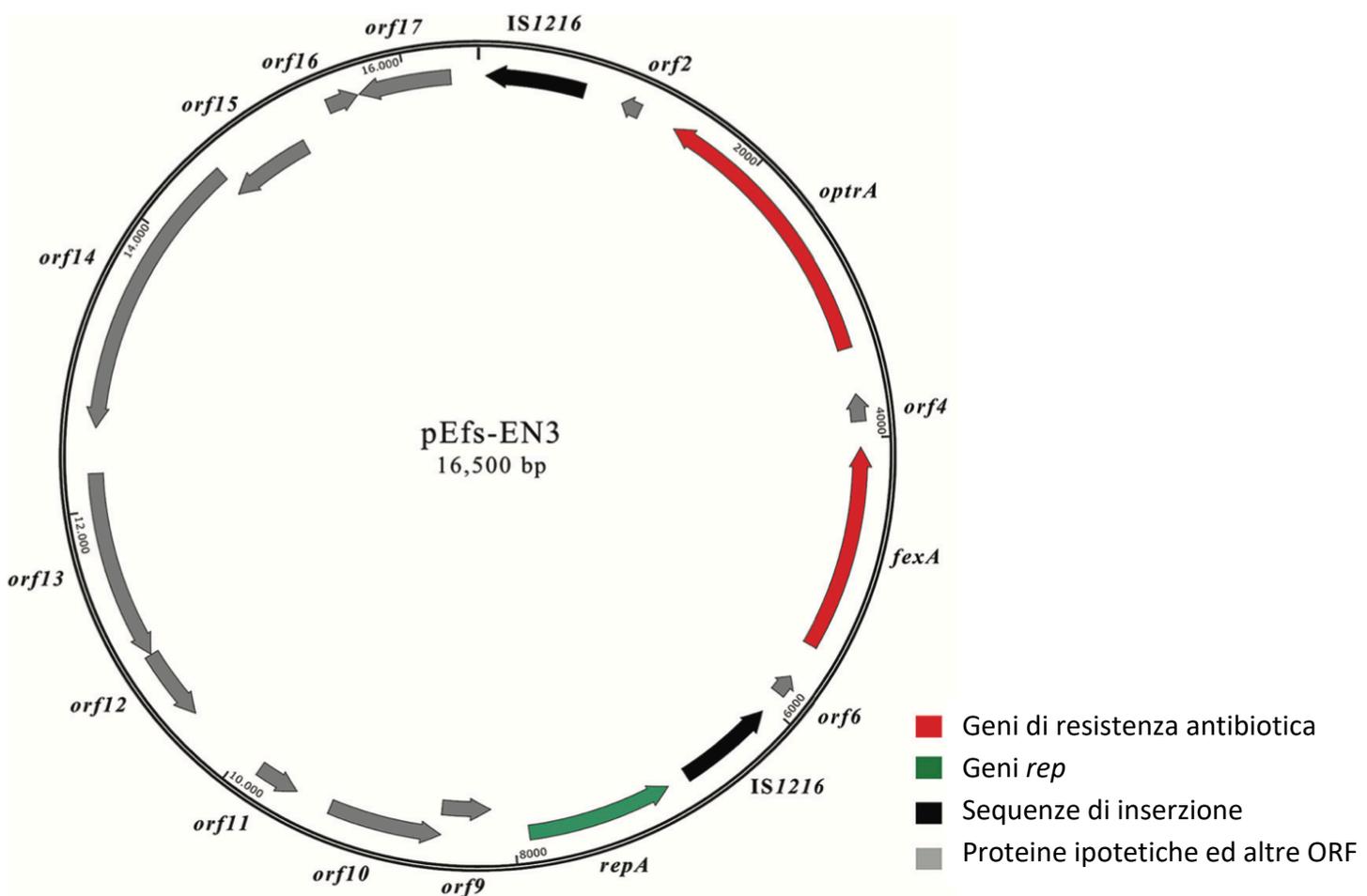


Figura 35. Rappresentazione schematica del plasmide pEfs-EN3 che trasporta *optrA* (16.500 bp) di *E. faecalis* EN3 (numero di accesso MT683614). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni.

Sulla base della nomenclatura definita da Morroni *et al.* (Morroni *et al.*, 2017) per le varianti *optrA*, *E. faecalis* EN3 esibiva la variante DP descritta in precedenza in diversi cloni di *E. faecalis* isolati da umani e maiali (Freitas *et al.*, 2020). Il contesto genetico di *optrA* (6.810 bp), rilevato nel plasmide pEfs-EN3, era caratterizzato dalla presenza di due elementi IS1216 con lo stesso orientamento che delimitavano, il gene di resistenza ai fenicoli *fexA*, situato a 687 bp a monte del gene *optrA*; un'organizzazione simile era stata precedentemente descritta in plasmidi di ceppi di *E. faecalis* isolati da cani in Cina (Wu *et al.*, 2019). pEfs-EN3 era caratterizzato anche dalla presenza di geni responsabili della partizione e replicazione del plasmide quali *repA*, *parA* e *prgN* (rispettivamente *orf8*, *orf10* e *orf11*, figura 35). Inoltre, pEfs-EN3 apparteneva alla famiglia di *replicon type* RepA_N contenente il gene *rep9*, tipico dei plasmidi sensibili ai feromoni sessuali di *E. faecalis* (Clewell *et al.* 2014). È interessante notare che nei ceppi di *E. faecalis* di origine suina sono stati precedentemente identificati plasmidi coniugativi contenenti il gene *optrA* e sensibili ai feromoni (Shang *et al.*, 2019).

(ii) Dal momento che dai saggi di ibridazione tutti gli isolati di *E. faecium* e i rispettivi transconiuganti (Tabella 10) condividevano un plasmide *poxtA*-positivo di circa 30 kb, si è deciso di prendere in considerazione il plasmide di *E. faecium* EF3 come rappresentante. Il gene *poxtA* era localizzato su un plasmide, denominato pEfm-EF3, di 27.703 bp con un contenuto in G+C pari al 35.0% (Numero d'accesso GenBank MT683615). Il contesto genetico del determinante di resistenza agli oxazolidinoni (4.003 bp), fiancheggiato da due elementi IS1216 aventi lo stesso orientamento, era inserito in un trasposone simile al Tn6657 contenente anche *fexB* e originariamente descritto in *S. aureus* AOUC-0915 isolato da un paziente affetto da fibrosi cistica (Numero di accesso GenBank MH746818) (D'Andrea *et al.*, 2019).

A monte del trasposone Tn6657-like, è stata trovata una regione responsabile della resistenza alla tetraciclina contenente i geni *tet(L)* e *tet(M)* disposti in tandem;

mentre a valle, sono stati rilevati quattro geni (da *orf28* a *orf31*) coinvolti nella partizione e replicazione del plasmide (Figura 36). Il plasmide pEfm-EF3 inoltre mostrava un'identità nucleotidica del 99% con una *coverage* del 100% con regioni di pC25-1 (Numeri di accesso GenBank MH784601) e pC27-2 (numero di accesso GenBank MH784602), due plasmidi Inc18 ad ampio spettro d'ospite identificati in un ceppo *E. faecium* di origine suina in Cina e appartenente al complesso clonale CC17 che comprende ceppi da epidemie ospedaliere con diffusione mondiale (Huang *et al.*, 2019).

Ulteriori analisi BLASTN hanno evidenziato che anche gli isolati *E. faecium* ES2 ed *E. faecium* TF3, possedevano il plasmide pEfm-EF3 di *E. faecium* EF3 nonostante siano stati isolati da diversi siti di campionamento (Figura 29).

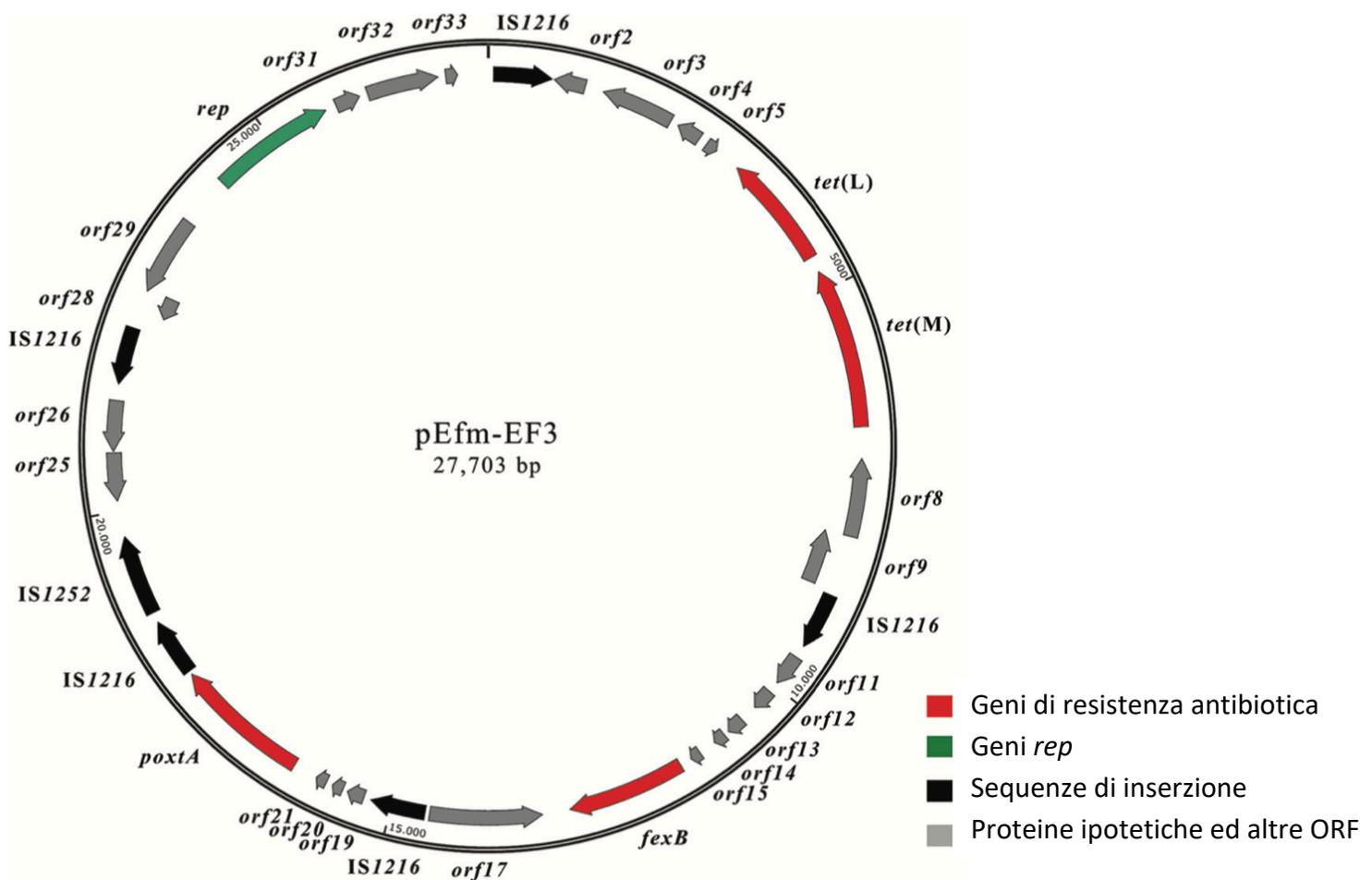


Figura 36. Rappresentazione schematica del plasmide rappresentante pEfm-EF3 recante *poxA* (27.703 bp) da *E. faecium* EF3 (numero di accesso MT683615). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni.

(iii) L'analisi WGS dei due ceppi *E. hirae* GE2 e GE5 ha rivelato che il determinante *poxA* era localizzato per entrambi su un plasmide di 24.793 bp, nonostante i due ceppi provenissero da diversi siti di campionamento (rispettivamente zooplancton e sedimento). Il plasmide, nominato pEh-GE2, aveva un contenuto in G+C pari al 38,0% (Numero di accesso GenBank MT683616) e mediante analisi BLASTN evidenziava due regioni con alti livelli di identità nucleotidica con diversi elementi genetici noti. La regione di 12.8 kb contenente il contesto genetico *poxA* (da *orf1* a *orf18*, figura 37) mostrava un alto livello di identità nucleotidica (99%) con il trasposone Tn6657-like (D'Andrea *et al.*, 2019). Come osservato in pEfm-EN3, il contesto genetico *poxA* è delimitato da due elementi IS1216 con lo stesso orientamento (Figura 37). La porzione di pEh-GE2, che si estende da *orf19* a *orf31* di 14.7 kb (Figura 37), veicolava la regione di coniugazione del trasposone Tn916 (incluso il gene *rep*) e mostrava un'identità nucleotidica del 99% con il plasmide 3 di *E. faecium* E4457 (Numero di accesso GenBank LR135260) isolato in Olanda da fonte sconosciuta.

Inoltre, pEh-GE2 apparteneva alla famiglia Rep_trans, che comprende piccoli plasmidi ampiamente diffusi tra le popolazioni di enterococchi (Clewell *et al.*, 2014).

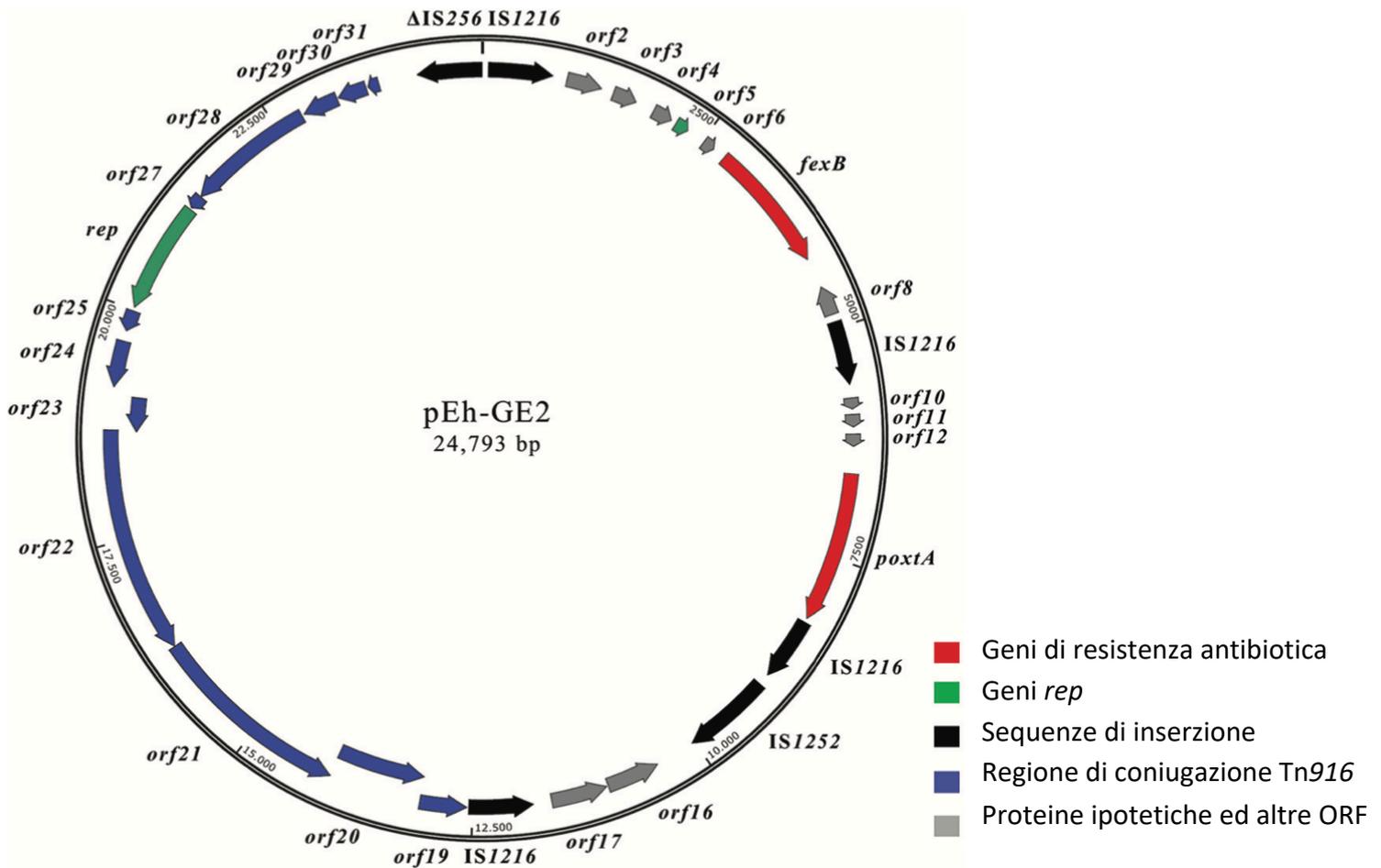


Figura 37. Rappresentazione schematica del plasmide rappresentante pEh-GE2 recante *poxA* (24.793 bp) da *E. hirae* GE2 (numero di accesso MT683616). Le frecce indicano le posizioni e le direzioni di trascrizione dei diversi geni.

È interessante notare che i plasmidi recanti *poxA* degli isolati di *E. hirae* ed *E. faecium* condividevano solo la regione del Tn6657-like (*coverage* del 55%; identità nucleotidica pari al 99%), suggerendo l'ampia diffusione di questo elemento genetico negli enterococchi.

I saggi di ibridazione hanno anche mostrato la presenza di un plasmide che trasporta *optrA* (di circa 140 kb) in *E. faecalis* EN3 e un plasmide *poxA* (di circa 100kb) in *E. hirae* GE2 e GE5, tuttavia, le analisi *in silico* eseguite mediante Nanopore ed illumina non hanno prodotto plasmidi con queste dimensioni. Come precedentemente descritto non possiamo escludere la presenza di una doppia copia del gene *optrA* in *E. faecalis* EN3 o che si verificano eventi di ricombinazione tra i plasmidi. Per quanto

riguarda *poxtA*, dal momento che il contesto genetico risulta essere instabile, è possibile che il determinante di resistenza possa essere mobilizzato e successivamente integrato in un plasmide di 100 kb.

L'analisi WGS ha inoltre escluso la presenza dei geni *cfr(B)*, *cfr(C)*, *cfr(D)* e *cfr(E)*. Non sono state rilevate mutazioni nei geni che codificano per l'rRNA 23S o per le proteine ribosomiali.

4 DISCUSSIONE

La resistenza antimicrobica rappresenta ad oggi una grave minaccia per la salute umana e una sfida per la sicurezza globale con importanti conseguenze economiche. Negli ultimi anni l'antibiotico-resistenza ha raggiunto proporzioni tali da indurre le Agenzie internazionali e nazionali, coinvolte nella tutela della salute pubblica, a lanciare l'allarme ed attuare iniziative con lo scopo di tenerla sotto controllo. Dall'ultimo rapporto europeo sulla resistenza antimicrobica, fornito dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), emergono stime sempre più preoccupanti: circa 33.000 decessi l'anno, di cui oltre 10.000 solo in Italia, sono conseguenza diretta di infezioni resistenti [Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 21/3)]. La grave crisi innescata dal diffondersi delle antibiotico-resistenze, per giunta aggravata dalla carenza di nuovi antibiotici, impone di preservare ad ogni costo le risorse ancora in nostro possesso. Tra queste molecole, un posto di rilievo è occupato dagli oxazolidinoni considerati in ambito clinico farmaci *last-resort* in quanto in grado di trattare anche infezioni gravi sostenute da germi MDR. Il linezolid, primo membro di questa classe di farmaci, mostra tutta una serie di ottime caratteristiche siano esse microbiologiche, farmacocinetiche, farmacodinamiche, tossicologiche e cliniche, che ne fanno tutt'ora uno dei farmaci più innovativi degli ultimi 20 anni. La molecola viene utilizzata in ambito ospedaliero come *last resort* 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). Oltre all'efficacia antimicrobica, il trattamento con linezolid offre il vantaggio di una somministrazione per via sia orale che parenterale, ridotti effetti collaterali, ma soprattutto una bassa percentuale di insuccesso terapeutico a causa di resistenze batteriche. La successiva approvazione del tedizolid da parte della FDA nel 2014 testimonia il successo di questa classe di antimicrobici. Il tedizolid

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). La loro natura sintetica e la ridondanza del loro sito di legame hanno indotto a pensare che fenomeni di antibiotico-resistenza non si sarebbero presentati con facilità e soprattutto in tempi così brevi. Contrariamente alle aspettative, già dopo un anno la messa in commercio del linezolid, sono comparsi ceppi resistenti a causa di mutazioni ribosomiali (rRNA 23S e proteine L3/L4) (Tsiodras *et al.*, 2001, Gonzales *et al.*, 2001). Nonostante 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 stato ed è motivo di grave preoccupazione per la comunità scientifica.

Il gene *cfr*, che codifica per una metiltrasferasi, è stato descritto prevalentemente in batteri Gram-positivi, ma non mancano segnalazioni in ceppi Gram-negativi di origine animale, ambientale e umana (Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). La sua diffusione è frutto di diversi fattori, tra i quali il suo basso impatto sulla fitness batterica, la presenza di varie sequenze di inserzione (*IS1216*, *ISEnfa4*, *ISEnfa5*, *IS256*) coinvolte nella mobilità del gene stesso e la co-localizzazione 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). In seguito, 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).

L'identificazione nel 2015 di *optrA*, un nuovo gene di resistenza agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid compreso), ha contribuito ad ampliare la conoscenza riguardo i meccanismi di resistenza verso questa classe di farmaci (Wang *et al.*, 2015). Il prodotto di *optrA* codifica per un meccanismo di resistenza completamente differente da *cfr*: Optra agisce da proteina di protezione ribosomiale (Sharkey *et al.*,

2016). 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; Desphande *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2020). Recentemente *optrA* è stato anche rilevato in un isolato *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 per la prima volta in Italia, in un MRSA isolato da una paziente statunitense con fibrosi cistica, è stato descritto un ulteriore determinante di resistenza agli oxazolidinoni (linezolid e tedizolid), ai fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo) e alle tetracicline denominato *poxxA* (Antonelli *et al.*, 2016, Antonelli *et al.*, 2018). Il gene *poxxA* codifica per una proteina di protezione ribosomiale che mostra un'identità amminoacidica del 32% con *OptrA*; entrambe le proteine appartengono infatti alla famiglia "ATP-Binding-Cassettes" della linea F (ABC-F), prive del dominio transmembrana (Antonelli *et al.*, 2018; Sharkey *et al.*, 2016).

Dopo la sua prima identificazione, *poxxA* è stato segnalato anche in enterococchi di origine animale come maiali e polli (Brenciani *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019), animali da carne e da produzione alimentare (Elghaieb *et al.*, 2019), nonché da campioni d'aria provenienti da un allevamento suino (Ruiz-Ripa *et al.*, 2020). *poxxA* è stato recentemente identificato nel letame di bestiame (Wang *et al.*, 2020) e persino nel microbioma dell'acqua potabile in contesti ambientali e clinici (Dias *et al.*, 2020).

I ceppi portatori di *poxxA* potrebbero quindi raggiungere bacini idrici, comprese le acque costiere, attraverso, ad esempio, la contaminazione del letame e il deflusso delle attività agricole e di allevamento con un pesante impatto sull'ambiente.

I geni di resistenza possono diffondersi nell'ambiente attraverso diverse vie di contaminazione e in seguito alle differenti attività antropiche in cui vi è un massiccio utilizzo di antibiotici. Le fonti possono essere diffuse nel caso di aree ad agricoltura intensiva, distretti industriali, attività umane distribuite sul territorio, o puntiformi

nel caso di impianti zootecnici intensivi, acquacoltura e scarichi fognari urbani e ospedalieri (Giardina *et al.*, Rapporti ISTISAN 21/3, 2021). In particolare, gli scarichi fognari urbani che spesso ricevono scarichi ospedalieri trattati e no, rappresentano tra le maggiori fonti di immissione di determinanti di resistenza nell'ambiente attraverso gli effluenti degli impianti di depurazione. L'utilizzo massivo degli antibiotici si traduce, non solo nel rilascio in ambiente di batteri resistenti e geni di resistenza, ma anche in notevoli quantitativi di farmaci che possono avere un ruolo cruciale nello sviluppo di tali resistenze (Michael *et al.*, 2013). Gli antibiotici non metabolizzati dal corpo umano vengono escreti attraverso l'urina e le feci, raggiungendo le acque reflue urbane e gli impianti di depurazione delle acque, dove generalmente non sono rimossi totalmente. Antibiotici e metaboliti vengono quindi immessi in corsi d'acqua, laghi o mare con le acque trattate oppure in suoli tramite l'utilizzo dei fanghi di depurazione come concime nei campi. L'Italia rappresenta uno dei paesi europei con più elevato consumo di antibiotici e sviluppo di resistenze sia in ambito veterinario che medico ospedaliero. In particolare, uno studio dedicato agli antibiotici ha mostrato come essi siano tra i composti più abbondanti nei reflui urbani e nelle acque di superficie (Castiglioni *et al.*, 2018).

Di conseguenza, la presenza di antibiotici in macro-ecosistemi quali suolo ed acqua desta particolare preoccupazione poiché il loro crescente utilizzo e il conseguente sviluppo di batteri multiresistenti comportano gravi rischi per la salute umana e animale (Grenni *et al.*, 2017).

L'ambiente marino è contraddistinto da una popolazione microbica di cui fanno parte anche batteri transienti derivanti dell'inquinamento umano causato principalmente dalle reti fognarie ospedaliere e domestiche e dagli allevamenti. Tra questi batteri spesso rileviamo gli enterococchi, membri del microbiota intestinale dell'uomo e degli animali, che vengono rilasciati in grandi quantità con le feci nell'ambiente e possono, pertanto, essere isolati non solo dal suolo, alimenti di origine animale e vegetale ma anche in bacini idrici. Proprio per questa ragione, lo

scopo di questo studio è stato quello di fornire un quadro generale sulla presenza di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi di origine ambientale più precisamente marina. Dal campionamento, eseguito su campioni marini di matrice zooplanctonica o sedimentale e in due zone costiere italiane: costa occidentale (Mar Ligure) e costa orientale (Mar Adriatico), è stato possibile isolare trentacinque enterococchi florfenicolo-resistenti. I risultati di PCR hanno evidenziato che il gene *optrA* è stato rilevato solo in isolati di *E. faecalis*, *poxtA* è stato identificato negli isolati di *E. faecium* e di *E. hirae*, mentre il gene *cfr* non è stato trovato in alcun ceppo.

Questi risultati genotipici, sebbene coinvolgano un limitato numero di ceppi, confermano che il gene *optrA* è prevalentemente identificato in *E. faecalis*, mentre i background genetici di *E. faecium* e delle specie enterococciche minori possono essere rilevanti per la diffusione del gene *poxtA* nella popolazione batterica (Deshpande *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2020, Brenciani *et al.*, 2022).

L'analisi filogenetica dei sei isolati positivi a geni di resistenza agli oxazolidinoni, ha mostrato che i ceppi appartenevano a sequence type (ST85, ST1710 e ST1711) di origine esclusivamente umana, identificati sia in ambito comunitario che nosocomiale. La presenza di ospedali e aree urbane in prossimità dei nostri siti di campionamento potrebbe aver contribuito alla contaminazione dei bacini idrici testati.

Infatti, i sistemi di depurazione delle acque sono progettati per eliminare efficacemente una serie di inquinanti di natura chimica e microbiologica (fosforo, metalli, batteri di origine fecale) ma per i nuovi microinquinanti, rilasciati nei reflui urbani, non ci sono ancora processi specifici di smaltimento.

Negli enterococchi, i geni di resistenza agli antibiotici sono principalmente localizzati su elementi genetici mobili come i plasmidi coniugativi che giocano un ruolo essenziale nella diffusione dei determinanti di resistenza (Clewell *et al.*, 2014). Dallo studio, infatti, emerge un altro dato preoccupante ovvero la localizzazione

plasmidica dei geni e quindi la possibilità di trasferimento, mediante coniugazione, di questi marker di resistenza a riceventi sensibili anche di specie enterococciche differenti. Inoltre, gli esperimenti di ibridazione hanno evidenziato la simultanea localizzazione (plasmidica e cromosomica) dei geni *optrA* e *poxA* all'interno dello stesso ceppo batterico, suggerendo sia la mobilità intracellulare dell'elemento che eventi di ricombinazione plasmidica mediati da sequenze di inserzione. L'analisi dei dati forniti dal WGS ha infatti chiarito la natura dei contesti genetici contenenti i determinanti di resistenza agli oxazolidinoni. Il contesto di *optrA*, fiancheggiato da due IS1216 con lo stesso orientamento e il gene *fexA* localizzato a 687 bp a monte, ha un'organizzazione simile a quella di plasmidi già precedentemente descritti in isolati di *E. faecalis* di origine canina in Cina (Wu *et al.*, 2019). I plasmidi recanti *poxA* negli isolati di *E. hirae* ed *E. faecium*, condividevano solo una regione del trasposone Tn6657-like descritta originariamente in un ceppo di MRSA umano, suggerendo quindi l'ampia diffusione di questo elemento anche negli enterococchi. La diffusione di *poxA* può in parte essere riconducibile alla capacità del suo contesto genetico di escindersi in forma circolare.

Anche la pressione selettiva operata dall'ampio utilizzo in medicina veterinaria di fenicoli e tetracicline, può aver contribuito alla sua diffusione in ambito animale (Schwarz *et al.*, 2021). Non è da sottovalutare inoltre la possibilità che ceppi *poxA*-positivi presenti nel letame (Cinthy *et al.*, 2022) possano aver contaminato vegetali o acque di irrigazione.

Complessivamente, questo studio è il primo a documentare la presenza di geni di linezolid-resistenza in enterococchi isolati dall'ambiente marino.

(sedimenti marini e zooplancton). Questa condizione potrebbe essere il risultato di uno *spillover* da serbatoi umani e/o animali di marker di oxazolidinone-resistenza in acque marine costiere che a loro volta potrebbero costituire dei *reservoir* per questi determinanti di resistenza.

Diventano perciò necessari ulteriori sforzi di sorveglianza e controllo per contrastare la diffusione di batteri resistenti al linezolid nell'uomo e negli animali volti a prevenire la formazione di serbatoi ambientali di geni di resistenza che potrebbero essere trasmissibili all'uomo attraverso numerose vie, tra cui la balneazione, l'acquacoltura e il consumo di frutti di mare.

Pertanto, risulta essere più che mai necessario uno sforzo congiunto e coordinato che riguarda un attento monitoraggio del resistoma umano, veterinario e ambientale secondo l'approccio *One Health*, tutto questo per preservare l'efficacia in ambito clinico di antibiotici *last-resort* come gli oxazolidinoni.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A. 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem J* 136:25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>.
2. Martínez, J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut* (157, 2893–2902).
3. Munk P, Knudsen BE, et al. Abundance and diversity of the fecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microb* (3, 898–908). 2018.
4. Werner G, Coque TM, Franz C, et al. Antibiotic resistant enterococci—tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol*. 2013;303: 360–79.
5. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;10(4):266-78. doi: 10.1038/nrmicro2761.
6. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)2018.
7. Bender J, Cattoir V, Hegstad et al. 2018. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat* (40:25–39). <https://doi.org/10.1016/j.drup.2018.10.002>.

8. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci* (1241:48-70), 2011.
9. Zhanel GG, Love R, Adam H, et al. Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs* [75(3):253-70], 2015.
10. Bozdogan B, Peter C. Appelbaum. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23 (2004) 113–119.
11. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy* (12 1759–1767), 2018.
12. 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.* [17(1-2):1- 12], 2014.
13. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* [358(9297):1975-82], 2001; DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06964-1.
14. Rybak JM, Roberts K. Tedizolid phosphate: a next-Generation oxazolidinone. *Infect Dis Ther* (4:1–14), 2015; DOI: 10.1007/s40121-015-0060-3.
15. 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.
16. Long KS, Vester B. 2012. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* (56:603–612). <https://doi.org/10.1128/AAC.05702-11>.
17. Wilson DN, Schluenzen F, *et al.* The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008 (105:13339–133344). <https://doi.org/10.1073/pnas.0804276105>.
18. Brenciani A, Morroni G, Schwarz S, Giovanetti E. 2022. Oxazolidinones: mechanisms of resistance and mobile genetic elements involved. *J Antimicrob Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dkac263>
19. 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.
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Bolmstrom A, Ballow CH, et al. Multicenter assessment of linezolid antimicrobial activity and spectrum in Europe: report from the Zyvox antimicrobial potency study (ZAPS-Europe). *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 791–800.
27. Shore AC, Brennan OM, Ehricht R, et al. Identification and characterization of the multidrug resistance gene cfr 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.
28. 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.
29. 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.
30. Billal DS, Feng J, Leprohon P. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics* 2011; 12: 512. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-512>.
31. Feng J, Lupien A, Gingras H *et al.* Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res* 2009; 19: 1214–23. <https://doi.org/10.1101/gr.089342.108>.
32. 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.
33. 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.

34. Keherenberg 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.
35. 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.
36. 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.
37. Schwarz S, Zhang W, *et al*. Mobile oxazolidinone resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2021. 34:e00188-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00188-20>.
38. Fioriti S, Coccitto SN, Morroni G *et al*. Detection of a chromosomal truncated *cfr* gene in a linezolid-susceptible LA-MRSA ST398 isolate of porcine origin, Italy. *J Glob Antimicrob Resist* 2021; 26: 199–201. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.06.008>.
39. Ruiz-Ripa L, Bellés-Bellés A, Fernández-Fernández R *et al*. Linezolid-resistant MRSA-CC398 carrying the *cfr* gene, and MRSA-CC9 isolates from pigs with signs of infection in Spain. *J Appl Microbiol* 2021; 131: 615–2. <https://doi.org/10.1111/jam.14988>.

40. Ruiz-Ripa L, Feßler AT, Hanke D *et al.* Coagulase-negative staphylococci carrying *cfr* and PVL genes, and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment. *Vet Microbiol* 2020; 243: 108631. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108631>.
41. Liu Y, Wang Y, Wu C *et al.* First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1650–4. <https://doi.org/10.1128/AAC.06091-11>
42. 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; 56: 3917–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-12>.
43. Wang Y, Wu CM *et al.* Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Proteus vulgaris* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2521–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr322>.
44. 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.
45. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH, Wolffs PF. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2013; 4:87. doi: 10.3389/fmicb.2013.00087 PMID: 23616784.

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. Candela T, Marvaud JC, Nguyen TK *et al.* A *cfr*-like gene *cfr*(C) conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50: 496–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.013>.
49. Zhang S, Liu P, Wang Y *et al.* Multiresistance gene *cfr*(C) in *Clostridium perfringens* of cattle origin from China. *J Antimicrob Chemother* 2021; 76: 3310–2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab339>.
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; 74: 1469–72. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz097>.
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. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.012>.
52. Guerin F, Sassi M, Dejoies L *et al.* Molecular and functional analysis of the novel *cfr*(D) linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 1699–703. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa125>.

53. Stojković V, Ulate MF, Hidalgo-Villeda F *et al.* *cfr*(B), *cfr*(C), and a new *cfr*-like gene, *cfr*(E), in *Clostridium difficile* strains recovered across Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 64: e01074-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01074-19>.
54. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, *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 (70:2182–2190). <https://doi.org/10.1093/jac/dkv116>.
55. 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.
56. Wilson DN, Haurlyuk V, *et al.* Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature reviews | Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>.
57. Tamang MD, Moon DC, Kim SR, *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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.035>.
58. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, *et al.* Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol Spectrum*, 2018. 6(4):ARBA-0032-2018. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.

59. Cavaco, LM, Korsgaard, H, *et al.* First detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in enterococci isolated from food products in Denmark. *J. Glob. Antimicrob. Resist*, 2017. 9,128–129.
60. Cai J, *et al.* Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010–2014, *Clinical Microbiology and Infection* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.007>.
61. Cui L, Wang Y, Lv Y, *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. doi:10.1128/AAC.01256-16.
62. 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.
63. 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. doi:10.3389/fmicb.2018.02189.
64. 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. doi: 10.3389/fmicb.2017.01631

65. 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: 1763–1769 doi:10.1093/jac/dky088.
66. 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. doi:10.1093/jac/dkz278.
67. Brenciani A, Fioriti S, Morroni G, *et al.* Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol – oxazolidinone – tetracycline resistance gene *poxtA*. *J Antimicrob Chemother*, 2019. doi:10.1093/jac/dky505.
68. Baccani I, Antonelli A, Di Pilato V *et al.* Detection of *poxtA2*, a presumptive *poxtA* ancestor, in a plasmid from a linezolid – resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021; 65: e0069521. <https://doi.org/10.1128/AAC.00695-21>.
69. Jung Y-H, Cha M-H, Woo G-J *et al.* Characterization of oxazolidinone and phenicol resistance genes in non-clinical enterococcal isolates from Korea. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021; 24: 363–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.01.009>.
70. Kim E, Shin SW, Kwak HS *et al.* Prevalence and characteristics of phenicol-oxazolidinone resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus*

- faecium* isolated from food-producing animals and meat in Korea. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11335.
71. Cinthi M, Coccitto SN, Fioriti S, *et al.* Occurrence of a plasmid co-carrying *cfr*(D) and *poxxA2* linezolid resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus casseliflavus* from porcine manure, Italy. *J Antimicrob Chemother*, 2021. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab456>.
72. Elghaieb H, Freitas AR, Abbassi MS *et al.* Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxxA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J Antimicrob Chemother*, 2019; 74: 2865–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz263>.
73. Kang Z-Z, Lei C-W, Yao T-G *et al.* Whole-genome sequencing of *Enterococcus hirae* CQP3-9, a strain carrying the phenicol – oxazolidinone – tetracycline resistance gene *poxxA* of swine origin in China. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019; 18: 71–3. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.012>.
74. 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 *poxxA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *J Antimicrob Chemother*, 2020 Jul 1;75(7):1704-1711.
75. Shan X, Li XS, Wang N, *et al.* Studies on the role of IS1216E in the formation and dissemination of *poxxA* – carrying plasmids in an *Enterococcus faecium* clade A1 isolate. *J Antimicrob Chemother*, 2020.

76. Shan X, Yang M, Wang N, *et al.* Plasmid Fusion and Recombination Events That Occurred during Conjugation of *poxtA*-Carrying Plasmids in Enterococci. *Microb. Spectrum*, 2022.
77. Xu C, Wang N, Li D, *et al.* Recombination events that occur in a *poxtA* – carrying *Enterococcus faecium* during the conjugation process. *J Antimicrob Chemother*, 2022; 77: 1228–36. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac027>.
78. Antonelli A, D’Andrea MM, Galano A, *et al.* Linezolid-resistant *cfr*-positive MRSA, Italy. *J Antimicrob Chemother*, 2016. doi:10.1093/jac/dkw108.
79. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022. CLSI, Wayne, PA.
80. Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, *et al.* *Sma*I macro-restriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist*, 2001. 7:65–71. <https://doi.org/10.1089/107662901750152828>.
81. Brenciani A, Morroni G, Pollini S, *et al.* Characterization of novel conjugative multiresistance plasmids carrying *cfr* from linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from Italy. *J Antimicrob Chemother*, 2016 71:307–313. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv341>.
82. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, *et al.* Comparative genomics of global *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* uncovers a common chromosomal hotspot for

optrA acquisition within a diversity of core and accessory genomes. *Microb Genom*, 2020. 6:e000350. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000350>.

83. 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. 9:15500. <https://doi.org/10.1038/s41598-01951918-y>.

84. Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, *et al.* Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology, p 309–320. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ed), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA, 2014.

85. Shang Y, Li D, Shan X, *et al.* Analysis of two pheromone-responsive conjugative multiresistance plasmids carrying the novel mobile *optrA* locus from *Enterococcus faecalis*. *Infect Drug Resist*, 2019 Aug 1; 12:2355-2362. doi: 10.2147/IDR.S206295.

86. Huang J, Wang M, Gao Y, *et al.* Emergence of plasmid-mediated oxazolidinone resistance gene *poxTA* from CC17 *Enterococcus faecium* of pig origin. *J Antimicrob Chemother*, 2019. 74:2524–2530. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz250>.

87. 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.

88. 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.
89. Shen J, Wang Y, Schwarz S. 2013. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cf*r in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* (68:1697–1706). <https://doi.org/10.1093/jac/dkt092>.
90. Wang Y, Li D, Song L, *et al.* First report of the multiresistance gene *cf*r in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8):4061- 4063. DOI: 10.1128/AAC.00713-13.
91. Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, *et al.* Detection of a New *cf*r-Like Gene, *cf*r(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.
92. 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.

93. 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.
94. Lei CW, Kang ZZ, Wu SK, *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. doi:10.1093/jac/dkz198.
95. Wang Y, Li X, Fu Y, *et al.* Association of florfenicol residues with the abundance of oxazolidinone resistance genes in livestock manures. *J Hazard Mater*, 2020. 399:123059. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123059>.
96. Dias MF, da Rocha Fernandes G, de Paiva MC, *et al.* Exploring the resistome, virulome and microbiome of drinking water in environmental and clinical settings. *Water Res*, 2020. 174:115630. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115630>.
97. Giardina S, Castiglioni S, Corno G, Fanelli R, Maggi C, Migliore L, Sabbatucci M, Sesta G, Zaghi C, Zuccato E. Approccio ambientale all'antimicrobico-resistenza. Roma: Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 21/3); 2021.
98. Michael I, Rizzo L, McArdell CS, *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research* 2013; 47:957-95.

99. Castiglioni S, Davoli E, Riva F, *et al.* Mass balance of emerging contaminants in the water cycle of a highly urbanized and industrialized area of Italy. *Water Research* 2018; 131:287-98.
100. 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.