

**PRIMA IDENTIFICAZIONE DEI GENI DI RESISTENZA AGLI
OXAZOLIDINONI *POXTA2* E *CFR(D)* IN UN ISOLATO DI
STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE SUBSP. *EQUISIMILIS* DI
ORIGINE SUINA**

**FIRST DETECTION OF THE OXAZOLIDINONE RESISTANCE
POXTA2 AND *CFR(D)* GENES IN *STREPTOCOCCUS
DYSGALACTIAE* SUBSP. *EQUISIMILIS* OF SWINE ORIGIN**

MASSACCI F.R.¹, COCCITTO N.S.², CINTHI M.³, ALBINI E.¹, CUCCO L.¹,
ORSINI M.⁴, GIOVANETTI E.³, BRENCIANI A.², MAGISTRALI C.F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy;

²Unit of Microbiology, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic
University of Marche Medical School, Ancona, Italy;

³Unit of Microbiology, Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University
of Marche, Ancona, Italy;

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italy.

Parole chiave: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, antibiotico-resistenza, oxazolidinoni
Keywords: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, antibiotic-resistance, oxazolidinones

RIASSUNTO

S. dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE) è un patogeno responsabile di infezioni sia nell'uomo che negli animali da produzione. Gli oxazolidinoni sono farmaci di ultima istanza utilizzati e approvati solo per uso umano, quindi non prescrivibili per uso veterinario, tuttavia anche l'uso di fenicoli e tetracicline può selezionare per geni di resistenza a questa classe antibiotica. Dati recenti indicano la presenza di geni che codificano la resistenza agli oxazolidinoni nelle specie di *Enterococcus* isolati da allevamenti suini italiani. In questo studio, riportiamo per la prima volta la presenza dei geni *poxtA2* e *cfp(D)* in un ceppo di *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolato da un suino proveniente da un allevamento italiano. Abbiamo identificato un nuovo plasmide, denominato pSdyV305, che è il risultato di un evento di ricombinazione tra un piccolo plasmide residente in un ceppo di SDSE e parte del plasmide enterococcico contenente i geni *cfp(D)/poxtA2/fexA*. La co-localizzazione del gene *poxtA2* con *cfp(D)* era stata descritta in tre isolati di *E. faecalis* da allevamenti suini italiani. Nell'azienda di origine, il florfenicolo era stato utilizzato nei due anni precedenti all'isolamento batterico, confermando l'importanza della pressione selettiva generata da altre molecole. La segnalazione di *poxtA2* in un potenziale agente zoonotico e in un nuovo genere batterico desta serie preoccupazioni per la salute pubblica a livello globale.

ABSTRACT

S. dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE) is a pathogen responsible for infection in humans and livestock. Oxazolidinones are last resort antimicrobial agents used in human medicine and are not administered for veterinary use. However, the use of phenicols or tetracyclines might also select for oxazolidinones resistance genes. Recent data indicate the presence of genes encoding oxazolidinones resistance in *Enterococcus* species isolated from Italian pig herds. In this study, we first identified a *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolate of porcine origin that harbors *cfp(D)* and *poxtA2* genes. We have identified a new plasmid, named pSdyV305, which resulted from a recombination event between a SDSE plasmid

and a region of another plasmid of a porcine *Enterococcus faecalis* encoding *cfr(D)/poxtA2/fexA*. Co-location of the *poxtA2* with *cfr(D)* gene was only detected in three *E. faecalis* isolates from Italian pig herds. In the farm of origin, florfenicol had been used in the two years before the SDSE identification, confirming the importance of the selective pressure generated by other antibiotic molecules. The detection of *poxtA2* in a potential zoonotic agent and in a new bacterial genus poses a serious threat to public health, worldwide.

INTRODUZIONE

Streptococcus dysgalactiae è una specie patogena sia per l'uomo che per gli animali. In base alle caratteristiche genetiche e biochimiche, *S. dysgalactiae* include in due sottospecie: *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD) (Vandamme et al., 1996). Considerato fino a poco tempo fa un patogeno esclusivamente animale, responsabile di infezioni in animali da allevamento, da affezione e selvatici, recentemente *S. dysgalactiae* è stato segnalato come agente causale di infezioni umane con un quadro clinico sovrapponibile a quello sostenuto da *Streptococcus pyogenes* (Oppegaard et al., 2017; Baracco, 2019). Infatti, l'infezione da SDSE nell'uomo può causare ascessi cutanei, faringite, artrite, batteriemia, endocardite e sindrome da shock tossico. A causa della gravità dell'infezione da SDSE nell'uomo, sono stati eseguiti studi volti sia alla caratterizzazione molecolare che al potenziale zoonotico di SDSE isolato da animali. Tuttavia, la maggior parte degli studi su SDSE in ambito veterinario sono limitati ai cavalli e solo pochi hanno caratterizzato isolati SDSE di origine suina (Silva et al., 2015; Pinho et al., 2016; Ciszewski and Szewczyk, 2017). Gli oxazolidinoni sono farmaci sintetici di ultima istanza utilizzati esclusivamente in ambito clinico per trattare infezioni causate da batteri Gram-positivi multi-resistenti agli antibiotici (MDR) inclusi lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), gli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), gli pneumococchi penicillino-resistenti e i micobatteri MDR. Gli oxazolidinoni, linezolid e tedizolid, legano al centro della peptidil transferasi–nel dominio V dell'rRNA 23S della subunità ribosomiale 50S–provocando l'inibizione della sintesi proteica. La resistenza al linezolid può insorgere in seguito a mutazioni nell'rRNA 23S e nelle proteine ribosomiali L3 e L4, ma anche per l'acquisizione di geni di resistenza trasferibili: *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(C)*, *cfr(D)*, *cfr(E)*, *optrA*, *poxtA* e *poxtA2* (Brenciani et al., 2022). La resistenza trasferibile è riconducibile a due meccanismi principali: (i) la metilazione post-trascrizionale dell'rRNA 23S da parte delle proteine Cfr e Cfr-like, che conferiscono resistenza a cinque classi di agenti antimicrobici tra cui fenicoli (cloramfenicolo e florfenicolo), lincosamidi, oxazolidinoni (linezolid), pleuromutiline e streptogramina di gruppo A (fenotipo PhLOPS_A) (Long et al., 2006), e (ii) la protezione ribosomiale operata da proteine ABC-F quali *OptrA*, *PoxtA* e *PoxtA2* con ridotta sensibilità a fenicoli e oxazolidinoni (incluso il tedizolid) (Brenciani et al., 2022). Sebbene gli oxazolidinoni siano stati approvati ad esclusivo uso umano, è stato rilevato un preoccupante aumento nel numero di enterococchi resistenti al linezolid sia in ambito veterinario (Fioriti et al., 2020; Brenciani et al., 2022; Cinthi et al., 2022; Coccitto et al., 2022) che ambientale (Ruiz-Ripa et al., 2020; Biggel et al., 2021; Fioriti et al., 2021). Il florfenicolo, ampiamente utilizzato in medicina veterinaria per trattare le infezioni degli animali da produzione, grazie o ad eventi di co-selezione, sembrerebbe favorire la diffusione, non solo di geni di resistenza ai fenicoli, ma anche di quelli agli oxazolidinoni, con conseguenze potenzialmente gravi per la salute umana. Per quanto riguarda il genere *Streptococcus*, i geni *cfr*, *cfr(D)* e *optrA* sono stati individuati solo in isolati cinesi di *Streptococcus suis* e *S. parasuis* di origine suina e in isolati clinici di *S. agalactiae* (Brenciani et al., 2022).

In questo studio, riportiamo per la prima volta la presenza dei geni *poxtA2* e *cfr(D)* in un ceppo di *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolato da un suino.

MATERIALI E METODI

Il ceppo batterico SDSE (V305) è stato isolato dal cervello di un suino affetto da polisierosite nel 2020 in Centro Italia. Il suino proveniva da un allevamento da ingrasso che allevava circa 120 suini/anno e che ha utilizzato il florfenicolo a scopo terapeutico nel 2019 e nel 2020. La colonia con morfologia riconducibile a SDSE, cresciuta in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) a 37°C in CO₂, è stata identificata mediante Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF Biotyper, Bruker Daltonics). I test di sensibilità agli antibiotici sono stati eseguiti mediante il metodo della microdiluizione in brodo ed interpretati seguendo i breakpoint clinici EUCAST (versione 12.0, www.eucast.org).

Il DNA genomico di V305 è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) e mediante saggi di PCR sono stati ricercati geni noti responsabili di resistenza agli oxazolidinoni (Fioriti et al., 2020). I geni trovati sono stati quindi sequenziati mediante il metodo Sanger.

Il DNA genomico di V305 è stato successivamente sequenziato utilizzando la piattaforma Illumina NextSeq 500. Dopo le fasi di *trimming* e valutazione della qualità, le sequenze sono state assemblate usando *SPAdes genome assembler v3.11.1* (Bankevich et al., 2012) a new assembler for both single-cell and standard (multicell. La sequenza ottenuta è stata utilizzata per la determinazione del *Sequence Type* (ST) utilizzando il database MLST per *S. dysgalactiae* (<https://pubmlst.org/organisms>). I geni di virulenza sono stati ricercati utilizzando BLASTN v2.13.0 (Camacho et al., 2009). Inoltre, al fine di caratterizzare gli elementi genetici di *cfp(D)* e *poxA2*, il genoma del ceppo SDSE V305 è stato ulteriormente sequenziato mediante MinION utilizzando un approccio *long-read sequencing*. Successivamente è stato eseguito un assemblaggio ibrido, mediante Unicycler v. 0.4.8 (<https://github.com/rwrick/Unicycler>), degli output delle piattaforme Illumina e Nanopore, seguito dall'annotazione utilizzando il server online *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST; <https://rast.nmpdr.org/>). Il resistoma del ceppo è stato studiato utilizzando la piattaforma online del *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) e nello specifico il tool ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>). La stabilità dei contesti genetici è stata valutata mediante saggi di PCR inversa utilizzando coppie di primer interne a *poxA* (5' – TTGGATTTTTGTCCGCCTGAA – 3') e *fexA* (5' – TTGGATTTTTGTCCGCCTGAA – 3') e dirette verso l'esterno.

RISULTATI

I test di sensibilità agli antibiotici hanno mostrato che SDSE V305 era resistente a tetraciclina, eritromicina, gentamicina, clindamicina, enrofloxacin e florfenicolo e sensibile a penicillina, ampicillina e ceftiofur, linezolid e tedizolid, cloramfenicolo e sulphametoxazolo+trimetoprim (Tabella 1). I risultati di PCR hanno evidenziato la presenza dei geni *cfp(D)* e *poxA*. Il sequenziamento di Sanger ha rivelato che, mentre il gene *cfp(D)* era identico al *wild type*, il gene *poxA* era in realtà la variante *poxA2*.

SDSE V305 è risultato positivo per i geni di virulenza *hasC*, *fbp54*, *mf3*. L'isolato mostrava un complesso resistoma: oltre a *cfp(D)* e *poxA2*, erano rilevabili *fexA* (resistenza ai fenicoli), *tet(O)* (resistenza alle tetracicline), *lnu(B)* (resistenza a lincosamidi), *lsa(E)* (resistenza a lincosamidi, streptogramina di gruppo A e pleuromutiline) e *ant(6)-Ia* (resistenza agli aminoglicosidi).

Tabella 1. Valori di MIC di SDSE V305 per le diverse molecole antibiotiche testate.
Table 1. MIC values of SDSE V305 for each tested antibiotic molecules.

Antibiotico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ceftiofur	0.25
Tetraciclina	32
Gentamicina	4
Florfenicolo	16
Penicillina	0.12
Enrofloxacin	1
Clindamicina	4
Eritromicina	128
Linezolid	2
Cloramfenicolo	8
Sulphametoxazolo+trimethoprim	1
Ampicillina	0.25
Tedizolid	0.25
Vancomicina	0.25

L'analisi WGS ha escluso la presenza di mutazioni ribosomiali e rivelato che SDSE V305 apparteneva ad un nuovo ST634 (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_sdysgalactiae_isolates).

L'analisi bioinformatica ha mostrato la presenza di un plasmide di 18.514 bp, denominato pSdyV305 (numero d'accesso: OQ299016) con 36 *Open Reading Frames* (ORFs) e un contenuto in G+C del 36%. Uno studio più approfondito ha evidenziato che pSdyV305 (Figura 1) è il risultato di un evento di ricombinazione tra il plasmide pSDSE159 (3.038 bp) di SDSE 159 (numero d'accesso: AP023395) e una regione del plasmide pV386 (16.111 bp) di *Enterococcus faecalis* V386 (numero d'accesso: MZ603802) di origine suina contenente i geni *cfi(D)/poxA2/fexA* (Cinhi et al., 2022). In pSdyV305, a seguito dell'inserzione della regione *cfi(D)/poxA2/fexA* in corrispondenza dell'estremità 5' del gene *repB*, 31 bp del gene *wild type* erano rimpiazzati da 33 nuovi nucleotidi. Inoltre, questa regione, fiancheggiata da due elementi *IS1216* con lo stesso orientamento, mostrava una duplicazione del sito bersaglio di 8 bp (GACAAGAG) (Figura 2).

Esperimenti di PCR inversa, hanno prodotto un amplicone di 3.213 bp sia in pV386 che in pSdyV305, dimostrando l'instabilità della regione che veicola i geni *cfi(D)/poxA2/fexA* (Figura 2).

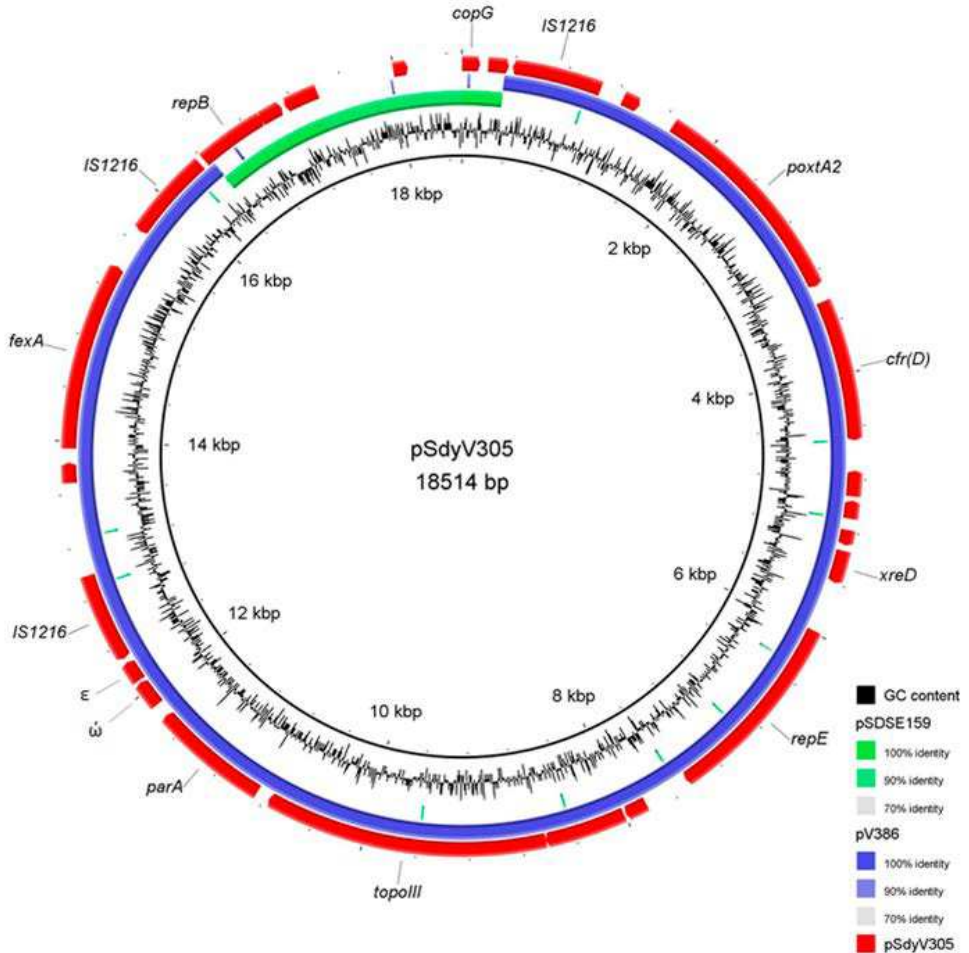


Figura 1. In figura sono messe a confronto le mappe circolari di pSdyV305 e di altri plasmidi, generate utilizzando il software BRIG. I plasmidi inclusi nell'analisi sono i seguenti (dall'interno verso l'esterno): (i) pSDSE di SDSE 159 (numero d'accesso: AP023395), (ii) pV386 di *E. faecalis* 386 (numero d'accesso: MZ603802); (iii) pSdyV305 di SDSE V305 (numero d'accesso: OQ299016). Le frecce rosse indicano le posizioni e gli orientamenti dei geni. Inoltre, vengono mostrati alcuni determinanti di resistenza agli antibiotici e alcuni geni significativi descritti in questo studio.

Figure 1. Circular map of the pSdyV305 plasmid in comparison with other plasmids using BRIG software. Plasmids included in the analysis were as follows: (inner to outer circles) pSDSE of SDSE 159 (accession no. AP023395), pV386 of *E. faecalis* 386 (accession no. MZ603802) and pSdyV305 of SDSE V305 (accession no. OQ299016). Red arrows indicate the positions and orientations of genes; some antibiotic resistance determinants and relevant genes described in this study are shown.

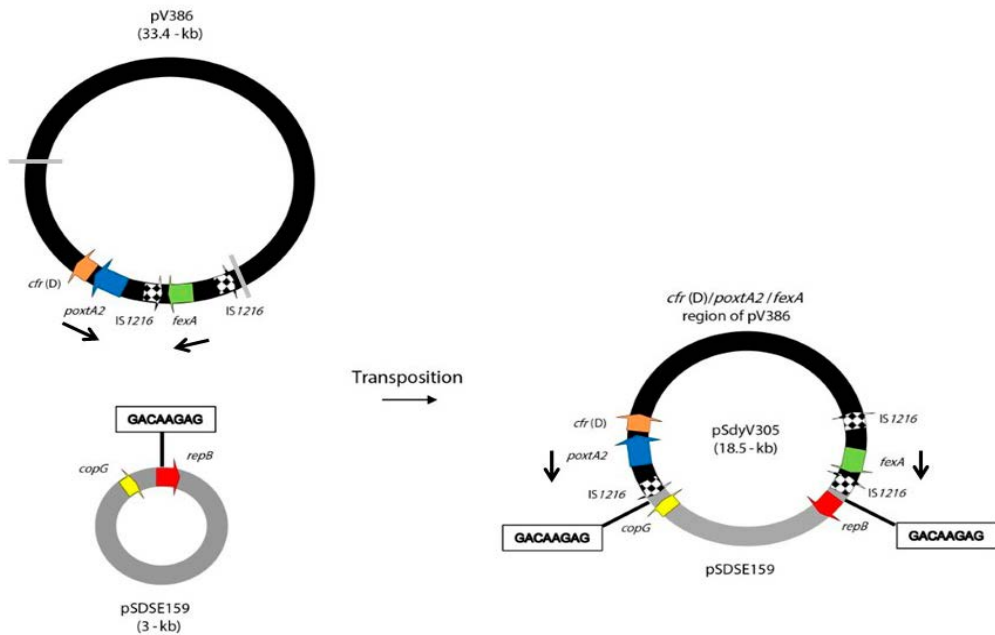


Figure 2. Rappresentazione grafica, non in scala, del processo di trasposizione mediante il quale pSDSE159 può ricombinarsi con pV386 per formare il plasmide pSDyV305 in SDSE V305. Le frecce sottili indicano i primer utilizzati per i test di stabilità. Le sequenze da 8 bp (GACAAGAG) sono rappresentate nel riquadro.

Figure 2. Graphical representation, not in scale, of a transposition process by which pSDSE159 may recombine with pV386 to form pSDyV305 plasmid in SDSEV305 strain. Thin arrows indicate the primers used for stability tests. The 8 bp sequences (GACAAGAG) are represented in the box.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta la prima segnalazione del gene *poxtA2*, un determinante di resistenza agli oxazolidinoni, in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

Ad oggi, *poxtA2* è stato segnalato solo in enterococchi prevalentemente di origine animale e la sua co-localizzazione con *cfr(D)* è stata descritta solo in tre ceppi di *E. faecalis* isolati da suini e da alimenti di origine animale (Brenciani et al., 2022).

Gli antibiotici somministrati in zootecnia sono spesso gli stessi usati in medicina umana o appartengono alla stessa classe farmacologica. Per preservarne l'efficacia terapeutica e limitare il diffondersi di patogeni resistenti, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha individuato e classificato alcuni antibiotici critici per l'uomo (*critically important antimicrobials*, CIA). Secondo la classificazione dell'OMS, gli oxazolidinoni rientrano tra le classi antimicrobiche di importanza critica per la salute dell'uomo con una alta priorità.

Nostri precedenti studi hanno documentato l'emergenza e la diffusione di geni di resistenza agli oxazolidinoni in enterococchi isolati da allevamenti suini (Fioriti et al., 2020; Cinthi et al., 2022; Coccitto et al., 2022) isolated from swine fecal samples collected from 76 pig farms, were investigated for the presence of *optrA*, *cfr*, and *poxtA* genes by PCR. Thirty florfenicol-resistant Enterococcus isolates had at least one linezolid resistance gene. *optrA* was found to be the most widespread linezolid resistance gene (23/30, pertanto appare

sempre più evidente il ruolo di serbatoio di geni di linezolid-resistenza, potenzialmente trasmissibili ai patogeni umani, svolto dai suini con gravi conseguenze per la salute umana. È interessante notare che il plasmide caratterizzato nel presente studio, pSdyV305, sia il risultato di un evento di ricombinazione tra un piccolo plasmide residente in un ceppo di SDSE e parte del plasmide enterococcico contenente i geni *cfr(D)/poxtA2/fexA* (Cinithi et al., 2022). L'utilizzo del florfenicolo negli allevamenti suinicoli, che determina una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche, potrebbe essere responsabile di questo evento di ricombinazione. Infatti, è noto che l'acquisizione della resistenza agli oxazolidinoni sia associata all'uso di fenicoli [legati ad *optrA* e *cfr(D)*] o tetracicline (legati a *poxtA*) negli allevamenti di animali da produzione (Antonelli et al., 2018; Elghaieb et al., 2019; Na et al., 2020; Ruiz-Ripa et al., 2020). C10004 and C10009, were recovered from air samples of a Spanish swine farm and comprehensively characterized. Methods Detection of linezolid resistance mechanisms (mutations and acquisition of resistance genes. Pertanto, la presenza dei geni *poxtA2* e *cfr(D)* nel nostro isolato potrebbe essere correlata ad un fenomeno di selezione innescato dall'impiego di queste molecole antibiotiche in azienda. L'ampio utilizzo di florfenicolo a fini terapeutici nei due anni precedenti l'isolamento batterico, potrebbe sostenere questa ipotesi.

CONCLUSIONI

La segnalazione dei geni *poxtA2* e *cfr(D)* in un potenziale agente zoonotico e in un nuovo genere batterico desta serie preoccupazioni per la salute pubblica a livello globale.

Sarebbe auspicabile implementare il monitoraggio di batteri resistenti agli oxazolidinoni negli animali destinati alla produzione alimentare, al fine di limitarne la diffusione. L'impiego di antibiotici, in particolare di fenicoli, in zootecnica dovrebbe pertanto essere limitato al fine di preservare l'efficacia terapeutica di farmaci last-resort come gli oxazolidinoni.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M., 2018. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1763–1769. doi:10.1093/jac/dky088
2. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
3. Baracco, G.J., 2019. Infections Caused by Group C and G Streptococcus (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol. Spectr.* 7. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0016-2018
4. Brenciani, A., Morroni, G., Schwarz, S., Giovanetti, E., 2022. Oxazolidinones: mechanisms of resistance and mobile genetic elements involved. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 2596–2621. doi:10.1093/jac/dkac263
5. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
6. Cinithi, M., Coccitto, S.N., Morroni, G., D'Achille, G., Brenciani, A., Giovanetti, E., 2022. Detection of an *Enterococcus faecium* Carrying a Double Copy of the *PoxtA* Gene from Freshwater River, Italy. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* 11. doi:10.3390/antibiotics11111618

7. Ciszewski, M., Szewczyk, E.M., 2017. Potential Factors Enabling Human Body Colonization by Animal *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Strains. *Curr. Microbiol.* 74, 650–654. doi:10.1007/s00284-017-1232-z
8. Coccitto, S.N., Cinthi, M., Fioriti, S., Morroni, G., Simoni, S., Vignaroli, C., Garofalo, C., Mingoia, M., Brenciani, A., Giovanetti, E., 2022. Linezolid-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate of swine origin carrying *cfr*, *optrA* and *poxtA* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 331–337. doi:10.1093/jac/dkab408
9. Crowe-McAuliffe, C., Murina, V., Turnbull, K.J., Huch, S., Kasari, M., Takada, H., Nersisyan, L., Sundsfjord, A., Hegstad, K., Atkinson, G.C., Pelechano, V., Wilson, D.N., Hauryliuk, V., 2022. Structural basis for PoxTA-mediated resistance to phenicol and oxazolidinone antibiotics. *Nat. Commun.* 13, 1860. doi:10.1038/s41467-022-29274-9
10. Elghaieb, H., Freitas, A.R., Abbassi, M.S., Novais, C., Zouari, M., Hassen, A., Peixe, L., 2019. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxtA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2865–2869. doi:10.1093/jac/dkz263
11. Fioriti, S., Morroni, G., Coccitto, S.N., Brenciani, A., Antonelli, A., Di Pilato, V., Baccani, I., Pollini, S., Cucco, L., Morelli, A., Panicià, M., Magistrali, C.F., Rossolini, G.M., Giovanetti, E., 2020. Detection of Oxazolidinone Resistance Genes and Characterization of Genetic Environments in Enterococci of Swine Origin, Italy. *Microorganisms* 8. doi:10.3390/microorganisms8122021
12. Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2500–2505. doi:10.1128/AAC.00131-06
13. Biggel, M., Magdalena, N.-I., Christoph, J., A., S.M.J., Roger, S., 2021. Genetic Context of *optrA* and *poxtA* in Florfenicol-Resistant Enterococci Isolated from Flowing Surface Water in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65, e01083-21. doi:10.1128/AAC.01083-21
14. Na, S.-H., Moon, D.-C., Kim, M.-H., Kang, H.-Y., Kim, S.-J., Choi, J.-H., Mechesso, A.-F., Yoon, S.-S., Lim, S.-K., 2020. Detection of the Phenicol-Oxazolidinone Resistance Gene *poxtA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Food-Producing Animals during 2008-2018 in Korea. *Microorganisms* 8. doi:10.3390/microorganisms8111839
15. Oppegaard, O., Mylvaganam, H., Skrede, S., Lindemann, P.C., Kittang, B.R., 2017. Emergence of a *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* stG62647-lineage associated with severe clinical manifestations. *Sci. Rep.* 7, 7589. doi:10.1038/s41598-017-08162-z
16. Pinho, M.D., Erol, E., Ribeiro-Goncalves, B., Mendes, C.I., Carriço, J.A., Matos, S.C., Preziuso, S., Luebke-Becker, A., Wieler, L.H., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., 2016. Beta-hemolytic *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from horses are a genetically distinct population within the *Streptococcus dysgalactiae* taxon. *Sci. Rep.* 6, 1–9. doi:10.1038/srep31736
17. Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Eichhorn, I., Schwarz, S., Torres, C., 2020. Detection of *poxtA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22, 28–31. doi:https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.012
18. Silva, L.G., Genteluci, G.L., Corrêa de Mattos, M., Glatthardt, T., Sá Figueiredo, A.M., Ferreira-Carvalho, B.T., 2015. Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human

- and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. *J. Med. Microbiol.* 64, 551–558. doi:10.1099/jmm.0.000052
19. Simona, F., Nina, C.S., Nicholas, C., Serena, S., Gianluca, M., Andrea, B., Gianmarco, M., Carla, V., Luigi, V., Francesca, B., Eleonora, G., 2021. Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02958-20. doi:10.1128/AEM.02958-20
 20. Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., Devriese, L.A., 1996. Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 774–781. doi:10.1099/00207713-46-3-774