

Studio della vancomicina resistenza in ceppi di *Enterococcus spp* isolati dal coniglio. Risultati preliminari

Cocchi M., Genero N., Clapiz L., Deotto S., Di Sopra G., Bregoli M., Di Giusto T.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy

Corresponding Author: Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676 - Email: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT: Vancomycin resistance in *Enterococcus spp.* strains isolated from rabbits. Preliminary results. *Enterococcus spp.* are part of normal intestinal flora both in humans and animals. Some strains, multidrug-resistant, can cause serious hospital- and community-acquired infections. One of the most important resistance is the vancomycin resistance. Vancomycin, a glycopeptide antibiotic, represents the last effective drug used to treat such infections in humans. Numerous studies have identified treatment with some glycopeptides as risk factors for acquiring vancomycin resistance both in humans and in animals. Nevertheless some vancomycin resistance strains are able to transfer the codifying resistance genes to other bacterial species. Due to the implications in public health, monitoring of antimicrobial resistance is of the utmost importance to preserve public health. In this study, we investigated the presence of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in 139 strains isolated from rabbit faecal samples. Bacterial strains were submitted to examination, using two different media (Slanetz Bartley and Slanetz Bartley with 6 mg/l of vancomycin). Vancomycin resistant strains were not found.

Key words: *Enterococcus spp.*, Vancomycin resistance, Rabbit.

INTRODUZIONE – Gli Enterococchi sono batteri Gram positivi, ubiquitari, normalmente presenti nell'ambiente e nel tratto gastroenterico di uomini ed animali. Essi sono caratterizzati dalla presenza di sequenze geniche codificanti la resistenza a differenti classi di antibiotici (beta-lattamici, aminoglicosidi e glicopeptidi) e dalla possibilità di trasferire questi geni ad altre specie batteriche commensali. Negli Enterococchi la resistenza agli antimicrobici può essere intrinseca (manifestandosi a basse concentrazioni di principio attivo) o acquisita. Nell'ambito dell'antibiotico resistenza particolare importanza rivestono i ceppi di Enterococchi vancomicina resistenti (VRE). La vancomicina è un antibiotico di natura glicopeptidica che agisce inibendo la formazione della parete batterica ed interferendo con la polimerizzazione del peptidoglicano. Recentemente sono stati individuati come patogeni emergenti responsabili, nell'uomo, di gravi infezioni soprattutto in ambito ospedaliero (Mundy *et al.*, 2000), sia in Europa che negli Stati Uniti (Leclerq *et al.*, 1988). Da un punto di vista epidemiologico la diffusione dei ceppi è stata inizialmente collegata all'ambiente ospedaliero negli Stati Uniti, a causa di un uso improprio nei protocolli terapeutici della vancomicina. In Europa, invece, l'insorgenza di VRE è stata provocata soprattutto dall'uso di avoparcina, un glicopeptide strutturalmente analogo alla vancomicina, utilizzato come auxinico negli alimenti per animali da reddito, sino al 1997, anno in cui nell'UE è stato definitivamente bandito. La resistenza ai glicopeptidi è determinata dalla

presenza di sei distinti *loci* genetici, denominati *Van A,B,C,D,E,G*, codificanti per i rispettivi pattern fenotipici. La capacità, invece, di trasferire geni è legata alla presenza, nel genoma batterico, di plasmidi e trasposoni. Geneticamente, la resistenza è determinata dalla sostituzione della sequenza terminale D-Ala-D-Ala del peptidoglicano con il dipeptide D-Ala-D-Lac nei fenotipi VanA, VanB e VanD, con D-Ala-D-Ser nei fenotipi VanC, VanE, Van G. I fenotipi Van A e Van B sono i più frequenti (Murray, 1998).

Scopo del presente studio è stato studiare la presenza di VRE in campioni di feci di conigli, provenienti da allevamenti del Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI – Nel periodo maggio 2010 - gennaio 2011, 139 campioni di feci di coniglio, provenienti da 15 allevamenti del Friuli Venezia Giulia, sono stati sottoposti alla ricerca di VRE. Le feci sono state inoculate in un brodo di pre-arricchimento, Tryptose Soy Broth (TSB, fornito dal Centro Servizi alla Produzione, CSP, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) in rapporto 1:10 (feci:terreno) ed incubati a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. Al termine dell'incubazione, 10 μl di brodocoltura sono stati trasferiti sul terreno Slanetz Bartley (SB, fornito dal CSP) e Slanetz Bartley addizionato con Vancomicina 6 mg/l (SB + VAN, fornito dal CSP), distribuiti sull'intera superficie servendosi di un'ansa ad L, sterile, monouso. Le piastre sono state incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore, mentre la brodocoltura è stata re-incubata a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per altre 18-24 ore. Al termine del periodo di incubazione si è proceduto a lettura delle piastre: i ceppi VRE crescono su entrambi i terreni sotto forma di colonie rosa-rosse, mentre i ceppi non vancomicina resistenti crescono solamente su SB, formando colonie rosa-rosso. Nel caso in cui, sulle piastre di SB e SB + VAN, non fosse stata riscontrata alcuna crescita batterica con morfologia attribuibile agli Enterococchi, si è proceduto ad una ulteriore semina del TSB sia su SB che su SB + VAN, incubando a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore (Del Grosso *et al.*, 2000). Quale controllo positivo di processo sia il terreno SB che il terreno SB+VAN sono stati inoculati con il ceppo di *E. faecalis* ATCC 51299.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Da tutti i campioni sottoposti ad indagine sono stati isolati ceppi di *Enterococcus spp.*; tutti i ceppi isolati sono risultati essere vancomicina sensibili (100%). Il ruolo degli animali quali reservoir di VRE è controverso ed ancora oggi oggetto di discussione. Studi condotti in Italia sul suino e sul pollo hanno evidenziato un'alta diffusione di ceppi VRE (Del Grosso *et al.*, 2000; Figaroli *et al.*, 2006), mentre studi condotti negli Stati Uniti da Hershberg *et al.* (2005) non hanno evidenziato ceppi VRE in diverse specie animali (bovino, suino, tacchino). In Europa, la selezione dei ceppi vancomicina resistenti è stata favorita dall'utilizzo ad esempio dell'avoparcina, glicopeptide simile alla vancomicina. In seguito al divieto di utilizzo in UE di sostanze promotrici della crescita, la colonizzazione da parte di ceppi VRE in alcune specie ad interesse zootecnico è diminuita in maniera significativa (Van den Bogaard *et al.*, 2000). Studi condotti sull'uomo hanno identificato nel trattamento con vancomicina, amikacina o cefalosporine ad ampio spettro un fattore di rischio nell'acquisizione della resistenza alla vancomicina negli enterococchi (Altouparlak *et al.*, 2011). Nel caso dei ceppi VRE, inoltre, la possibilità di trasferire i geni codificanti l'antibiotico resistenza ad altre specie batteriche (Biavasco *et al.*, 1996) e dall'animale all'uomo lungo la filiera produttiva costituisce un importante elemento di indagine per preservare la salute pubblica. Ad esempio, la descrizione di ceppi di *Staphylococcus*

aureus vancomicina intermedi e resistenti (VISA, VRSA) indica l'acquisizione della resistenza al glicopeptide da parte dei ceppi di *S. aureus*, dovuta alla condivisione della medesima nicchia ecologica con ceppi VRE (Noble *et al.*, 1992). Da un punto di vista terapeutico, la vancomicina costituisce uno degli antibiotici di elezione nel trattamento delle infezioni stafilococciche umane. Considerando il possibile effetto che la resistenza agli antimicrobici ha sulla salute umana e il suo impatto economico, si rendono necessarie misure di controllo per prevenire il diffondersi di patogeni resistenti dall'animale all'ambiente e all'uomo. Secondo la Direttiva Europea 2003/99 "sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici", recepita dal D.lvo 191/2006, all'articolo 7, si indica infatti agli Stati membri di provvedere alla sorveglianza della resistenza agli antimicrobici, fornendo dati relativi all'incidenza di casi di resistenza agli antimicrobici non solo negli agenti zoonotici ma anche in altri agenti, nella misura in cui questi ultimi possano costituire una minaccia per la sanità pubblica.

BIBLIOGRAFIA – **Altoparlak**, U., Koca, O., Ozkurt, Z., Akcay, M.N., 2011. Incidence and risk factors of vancomycin resistant enterococcus colonization in burn unit patients. *Burns* 37:49-53. **Biavasco**, F., Giovannelli, E., Miele, A., Vignaioli, C., Facinelli, B., Varaldo P.E., 1996. In vitro conjugative transfer of Van A vancomycin resistance between enterococcus and listeriae of different species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 15:50-59. **Del Grosso**, M., Caprioli, A., Chinzari, P., Fontana, M.C., Pezzetti, G., Manfrin, A., Di Giannatale, E., Goffredo, E., Pantosti, A., 2000. Detection and characterization of vancomycin resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb. Drug Resis.* 6:313-318. **Figaroli**, B.M., Ossiprandi M.C., 2006. Ceppi antibiotico-resistenti di Enterococcus. *Ann. Fac. Medic. Vet di Parma*, Vol. XXVI, pp. 219-234. **Hershberg**, E., Oprea, F.S., Donabedian S. M., Perry, M., Bozigar, P., Bartlett, P., Zervos, M.J., 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in Enterococci of animal origin. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 55:127-130. **Leclercq**, R., Derlot, E., Duval, J., Curvalin, P., 1988. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319:157-161. **Mundy**, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M., 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:513-522. **Murray**, B.E., 1998. Diversity among multidrug resistant enterococci. *Synopses, Emerg. Infect. Dis.* 4:37-47. **Noble**, W.C., Virani, Z., Cree, R.G.A., 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *E. faecalis* NCTC 12201 to *S. aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 93:195-198. **Van den Bogaard**, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14:327-335.