

# DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI DI ENTEROCOCCHI ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

## ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM FOOD OF ANIMAL ORIGIN

FRANCESCA PEDONESE <sup>(1)</sup>, ROBERTA NUVOLONI <sup>(1)</sup>, CARLO D'ASCENZI <sup>(1)</sup>,  
BRUNO GERARDO <sup>(1)</sup>, SARA ARMANI <sup>(2)</sup>, SALVO RINDI <sup>(1)</sup>

### RIASSUNTO

Gli enterococchi costituiscono una parte importante delle microflоре intestinali di uomo ed animali e sono ampiamente distribuiti nell'ambiente esterno. Sono pertanto isolabili da molti alimenti, specialmente di origine animale. Essi hanno inoltre un ruolo di rilievo come agenti di infezioni nosocomiali, anche in virtù della loro capacità di acquisire resistenze nei confronti di diversi antimicrobici usati in terapia. Scopo del presente lavoro è la determinazione del pattern di sensibilità nei confronti di 16 antimicrobici di 68 ceppi di enterococchi isolati da prodotti di origine animale, sia lattiero-caseari che carni, commercializzati in Toscana. I ceppi, identificati fenotipicamente, sono risultati appartenere alle specie *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* ed *E. durans*. Tutti sono risultati resistenti a ceftazidime e sulfisoxazolo ed hanno evidenziato alte percentuali di resistenza di tipo "low-level" agli aminoglicosidi, come prevedibile. Una percentuale di resistenza superiore al 40% è stata riscontrata per rifampicina, eritromicina, nitrofurantoina, ciprofloxacina e superiore al 20% per penicillina e tetraciclina. La resistenza verso la quinopristina/dalfopristina è risultata, per *E. faecium*, dell'8,7% nei ceppi di origine lattiero-casearia e del 13,3% in quelli di derivazione carnea. Resistenza di tipo "high-level" verso la gentamicina è stata riscontrata in percentuale dell'11,7% e quasi esclusivamente a carico di *E. faecalis*. Gli isolati sono risultati altamente sensibili ai glicopeptidi, all'imipenem e, relativamente ad *E. faecium* e *E. faecalis*, all'amoxicillina. Nonostante il rilievo di percentuali piuttosto elevate di ceppi multiresistenti, gli enterococchi in esame si sono rivelati generalmente sensibili ai più importanti antimicrobici di uso terapeutico nell'uomo.

Parole chiave: enterococchi, antimicrobici, formaggi, prodotti carni

### SUMMARY

Enterococci constitute an important part of the intestinal flora of both animals and men. They are widely distributed in the environment and in many foods, especially of animal origin. They also represent a cause of nosocomial infections of increasing significance also

---

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

<sup>(2)</sup> Collaboratore Esterno.

Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

considering that they are known to be able to acquire resistance to many antimicrobials used in medical practice. Aim of this work was to determine the susceptibility to 16 antimicrobial agents by the disk diffusion method for 68 enterococcal strains isolated from both dairy and meat products, purchased at retail level in Tuscany. The strains, phenotypically identified, belonged to *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* and *E. durans* species. All isolates were resistant to ceftazidime and sulfisoxazole and showed high percentages of “low-level” resistance to aminoglycosides, as expected. A percentage of resistance of more than 40% was registered for rifampicin, erythromycin, nitrofurantoin, ciprofloxacin and of more than 20% for penicillin and tetracycline. With regard to *E. faecium*, resistance to quinupristin/dalfopristin ranged from 8,7% in dairy strains to 13,3% in those from meat products. “High-level” resistance to gentamicin was found in percentage of 11,7% and almost exclusively in *E. faecalis* strains. Finally, the isolates resulted highly susceptible to glycopeptides, imipenem and, with regard to *E. faecium* and *E. faecalis*, to amoxicillin. Though an high percentage of multiresistant strains was registered, the studied strains revealed to be generally susceptible to the most important antimicrobials of therapeutic use in humans.

Key words: enterococci, antimicrobials, cheese, meat products

## INTRODUZIONE

Gli enterococchi sono batteri ubiquitari, che si ritrovano in numero variabile in numerosi alimenti, soprattutto di origine animale. Essi costituiscono infatti una parte della microflora intestinale di mammiferi e uccelli, per cui vengono rilasciati con le deiezioni umane ed animali nell’ambiente esterno, dove sono in grado di sopravvivere in virtù della loro tolleranza a condizioni sfavorevoli (Kühn et al., 2000). In clinica umana sono riconosciuti come una delle principali cause di infezioni nosocomiali, specialmente in categorie di pazienti particolari (Ellerbroek et al., 2004), come quelli con patologie croniche ed immunodepressi.

Per gli enterococchi è nota una serie di antibiotico-resistenze intrinseche, che include cefalosporine, aminoglicosidi (resistenza di tipo “low-level”), polimixine, lincosamidi; inoltre possono essere acquisite resistenze verso glicopeptidi, macrolidi, tetracicline, cloramfenicolo, trimethoprim/sulfametossazolo, rifampicina, aminoglicosidi (resistenza di tipo “high-level”), ampicillina (Peters et al., 2003). Ceppi multiresistenti vengono comunemente isolati da uomo, liquami, ambienti acquatici, ambienti agricoli, animali, potendo quindi penetrare nella catena alimentare (Lukasova & Sustackova, 2003).

Scopo del presente lavoro è la valutazione del livello di resistenza nei confronti delle principali categorie di antimicrobici in enterococchi isolati da alimenti di origine animale prelevati dal commercio.

## MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono stati utilizzati 68 ceppi di enterococchi isolati da 29 campioni, di cui 15 lattiero-caseari (formaggi e ricotta) e 14 prodotti di salumeria

(salami e salsicce), commercializzati in Toscana nel periodo 2003-2004: i campioni lattiero-caseari provenivano sia dalla Toscana che da altre regioni italiane, mentre i prodotti di salumeria provenivano dalla sola Toscana. Per ogni campione da analizzare sono stati prelevati sterilmente 10 g e sono state allestite diluizioni decimali rispettivamente in citrato di sodio al 2% per i lattiero-caseari e in acqua peptonata (Peptone Water, Oxoid) per i prodotti carnei. L'isolamento degli enterococchi è stato effettuato da Kanamycin Aesculin Azide Agar (Oxoid) incubato a 44°C per 24-48 ore. L'identificazione presuntiva è avvenuta sulla base delle seguenti prove: colorazione di Gram, catalasi, idrolisi dell'esculina, attività pirrolidonil-arilamidasi (O.B.I.S.-PYR, Oxoid), sviluppo in brodo Brain Heart Infusion (B.H.I., Oxoid) al 6,5% di NaCl. I cocci Gram positivi, catalasi negativi, in grado di idrolizzare l'esculina, pirrolidonil-arilamidasi positivi e in grado di sviluppare in presenza del 6,5% di NaCl sono stati sottoposti ad identificazione di specie tramite test biochimici convenzionali (API 20 STREP, bioMérieux), utilizzando il software Apiweb V 1.1.0 (API 20 STREP V 6.0) per l'interpretazione dei dati ottenuti. Gli isolati sono stati quindi conservati a -80°C in B.H.I. contenente il 15% di glicerolo sterile. Il pattern di sensibilità agli antimicrobici è stato determinato secondo il "disc diffusion method" (Bauer et al., 1966) su Mueller Hinton Agar (Oxoid) con incubazione di 24 ore a 37°C. Sono stati impiegati 16 antimicrobici (Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Oxoid), indicati in Tab. 1, insieme ai rispettivi dosaggi. I diametri degli aloni di inibizione ottenuti sono stati interpretati secondo le indicazioni del produttore. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 è stato utilizzato come controllo.

<b>Tab. I.</b> Antimicrobici utilizzati. <i>Antimicrobials utilized.</i> ( <i>continua</i> )	
Nome (sigla) <i>Name (abbreviation)</i>	Dosaggio <i>Concentration</i>
Vancomicina (VA) <i>Vancomycin</i>	30 µg
Teicoplanina (TEC) <i>Teicoplanin</i>	30 µg
Sulfisoxazolo (SF) <i>Sulfisoxazole</i>	300 µg
Ceftazidime (CAZ) <i>Ceftazidime</i>	30 µg
Nitrofurantoina (F) <i>Nitrofurantoin</i>	300 µg
Penicillina G (P) <i>Penicillin G</i>	10 U.I. 10 units
Amoxicillina (AMC) <i>Amoxicillin</i>	10µg
Tetraciclina (TE) <i>Tetracycline</i>	30 µg
Streptomicina (S) <i>Streptomycin</i>	10 µg

(segue) **Tab. I.** Antimicrobici utilizzati. *Antimicrobials utilized.*

Nome (sigla) <i>Name (abbreviation)</i>	Dosaggio <i>Concentration</i>
Gentamicina alto dosaggio (CN120) <i>High-level gentamicin</i>	120 µg
Rifampicina (RD) <i>Rifampicin</i>	30 µg
Eritromicina (E) <i>Erythromycin</i>	15 µg
Ciprofloxacina (CIP) <i>Ciprofloxacin</i>	5 µg
Quinopristina/dalfopristina (QD) <i>Quinupristin/dalfopristin</i>	15 µg
Imipenem (IMP) <i>Imipenem</i>	10 µg

## RISULTATI

Sulla base dell'identificazione fenotipica i ceppi in esame sono risultati appartenere alle seguenti specie: *Enterococcus faecium* (55,9%), *E. faecalis* (29,4%), *E. durans* (14,7%). Tutti i ceppi presentavano una percentuale di probabilità di identificazione corretta ("% id."), calcolata dal software, maggiore del 90%. In Tab. II si riportano i dati complessivi relativi alle resistenze verso gli antimicrobici considerati, mentre nelle Tab. III e IV tali dati vengono mostrati distinguendo in base all'origine dei ceppi e per singola specie.

**Tab. II.** Resistenza agli antimicrobici dei ceppi di enterococchi in esame. *Antimicrobial-resistance of the tested enterococcal strains. (continua)*

Sigla <i>Abbreviation</i>	Ceppi <i>Strains</i> N.=68	
	R (%)	I (%)
VA	2 (2,9)	16 (23,5)
TEC	0 (0)	11 (16,2)
SF	68 (100)	0 (0)
CAZ	68 (100)	0 (0)
F	30 (44,1)	11 (16,2)
P	24 (35,3)	2 (2,9)
AMC	9 (13,2)	0 (0)
TE	18 (24,5)	11 (16,2)
S	66 (97,1)	2 (2,9)
CN10	47 (69,1)	13 (19,1)
CN120	8 (11,7)	0 (0)

(segue) **Tab. II.** Resistenza agli antimicrobici dei ceppi di enterococchi in esame. *Antimicrobial-resistance of the tested enterococcal strains.*

Sigla Abbreviation	Ceppi Strains N.=68	
E	31 (45,6)	34 (50)
CIP	29 (42,6)	31 (45,6)
QD	26 (38,2)	17 (25)
IMP	3 (4,4)	1 (1,5)

Legenda:  
 R (%): numero di ceppi resistenti (percentuale). *Number of resistant strains (percentage).*  
 I (%): numero di ceppi intermedi (percentuale). *Number of intermediate strains (percentage).*  
 N. = numero di ceppi della specie in esame. *Number of strains of each species.*

**Tab. III.** Resistenza agli antimicrobici dei ceppi di origine lattiero-casearia distinti per specie. *Antimicrobial resistance of dairy enterococcal strains, by species.*

Sigla Abbreviation	E. fm N.=23		E. fs N.=11		E. du N.=8	
	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)
VA	0 (0)	3 (13)	0 (0)	5 (45,4)	0 (0)	1 (12,5)
TEC	0 (0)	4 (17,4)	0 (0)	2 (18,2)	0 (0)	1 (12,5)
SF	23 (100)	0 (0)	11 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)
CAZ	23 (100)	0 (0)	11 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)
F	15 (65,2)	4 (17,4)	0 (0)	0 (0)	5 (62,5)	2 (25)
P	9 (39,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	0 (0)
AMC	1 (4,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	0 (0)
TE	2 (8,7)	2 (8,7)	4 (36,4)	0 (0)	0 (0)	4 (50)
S	22 (95,7)	1 (4,3)	11 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)
CN10	13 (56,6)	5 (21,7)	10 (90,9)	1 (9,1)	6 (75)	2 (25)
CN120	1 (4,3)	0 (0)	3 (27,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RD	11 (47,8)	2 (8,7)	4 (36,4)	4 (36,4)	6 (75)	1 (12,5)
E	10 (43,5)	12 (52,2)	1 (9,1)	8 (72,8)	5 (62,5)	3 (37,5)
CIP	13 (56,5)	6 (26,1)	0 (0)	8 (72,8)	4 (50)	4 (50)
QD	2 (8,7)	6 (26,1)	8 (72,8)	2 (18,2)	4 (50)	3 (37,5)
IMP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)

Legenda:  
 E. fm: *Enterococcus faecium* - E. fs: *Enterococcus faecalis*  
 E. du: *Enterococcus durans* - N.= numero di ceppi della specie in esame. *Number of strains of each species.*  
 R (%): numero di ceppi resistenti della singola specie (percentuale). *Number of resistant strains of each species (percentage)* - I (%): numero di ceppi intermedi della singola specie (percentuale). *Number of intermediate strains of each species (percentage).*

**Tab. IV.** Resistenza agli antimicrobici dei ceppi da prodotti carnei distinti per specie.  
*Antimicrobial-resistance of enterococcal strains from meat products, by species.*

Sigla <i>Abbreviation</i>	E. fm N.=15		E. fs N.=9		E. du N.=2	
	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)
VA	0 (0)	1 (6,7)	2 (22,2)	6 (66,7)	0 (0)	0 (0)
TEC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33,3)	0 (0)	1 (50)
SF	15 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
CAZ	15 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
F	5 (33,3)	5 (33,3)	3 (33,3)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
P	6 (40)	2 (13,3)	4 (44,4)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
AMC	2 (13,3)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
TE	6 (40)	3 (20)	5 (55,6)	1 (11,1)	1 (50)	1 (50)
S	14 (93,3)	1 (6,7)	9 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
CN10	7 (46,7)	5 (33,3)	9 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
CN120	0 (0)	0 (0)	4 (44,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RD	7 (46,7)	3 (20)	4 (44,4)	2 (22,3)	0 (0)	2 (100)
E	9 (60)	6 (40)	5 (55,6)	4 (44,4)	1 (50)	1 (50)
CIP	7 (46,7)	7 (46,7)	3 (33,3)	6 (66,7)	2 (100)	0 (0)
QD	2 (13,3)	5 (33,3)	9 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
IMP	3 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Legenda: vedi Tab. III. *As Tab. III.*

Infine in Tab. V viene evidenziata la situazione relativa alle resistenze multiple nei ceppi in esame.

**Tab. V.** Multiresistenze negli enterococchi in esame. *Multiresistance of the tested enterococcal strains.*

Numero <i>Number</i> *	E. fm MR (%) N.=38	E. fs MR (%) N.=20	E. du MR (%) N.=10	Totale <i>Total</i> (%)
fino a 3 <i>up to 3</i>	17 (44,8)	9 (45)	0 (0)	26 (38,2%)
4	4 (10,5)	5 (25)	3 (30)	12 (17,7)
5	6 (15,8)	1 (5)	0 (0)	7 (10,3)
6 o più <i>6 or more</i>	11 (28,9)	5 (25)	7 (70)	23 (33,8)

Legenda:  
E. fm: *Enterococcus faecium* - E. fs: *Enterococcus faecalis*  
E. du: *Enterococcus durans* - N.= numero di ceppi della specie in esame - *number of strains of each species* - MR (%): numero di ceppi multiresistenti della singola specie (percentuale)- *number of multiresistant strains of each species (percentage)*  
\*: resistenza a SF e CAZ non considerate - *resistance to SF and CAZ not considered*

## DISCUSSIONE

Sulla base dei dati ottenuti, per quanto numericamente limitati, accanto al rilievo delle note resistenze intrinseche verso cefalosporine, sulfisoxazolo, aminoglicosidi a basso dosaggio e, limitatamente a *Enterococcus faecalis*, quinopristina/dalfopristina (Peters et al., 2003), si può notare come in generale i livelli più alti di resistenza siano stati riscontrati nei confronti di rifampicina, eritromicina, nitrofurantoina, ciprofloxacina e, in misura minore, per penicillina e tetraciclina. Del resto tali dati trovano un riscontro simile in quelli ottenuti da altri Autori, specialmente in prodotti carnei (Busani et al., 2004; Sustackova et al., 2004; Martin et al., 2005). Per quanto riguarda i ceppi di origine lattiero-casearia la situazione è più variegata, con risultati di elevata sensibilità agli antimicrobici in alcuni casi (Mannu et al., 2003; Lopes et al., 2005) e con valori elevati di resistenze verso importanti categorie di antimicrobici in altri (Citak et al., 2005).

Il dato complessivo relativo a quinopristina/dalfopristina viene parzialmente ridimensionato, considerando l'alta percentuale di resistenza rilevata, come atteso, in *E. faecalis*: in *E. faecium* le percentuali di resistenza sono state dell'8,7% per i ceppi lattiero-caseari e del 13,3% in quelli di derivazione carnea contro il 29% riferito da Peters et al. (2003) in ceppi alimentari di varia origine.

Relativamente ad *E. faecium* ed *E. faecalis*, il livello di resistenza nei confronti di  $\beta$ -lattamici e tetraciclina è risultato maggiore per i ceppi di provenienza carnea rispetto a quelli lattiero-caseari.

È da registrare inoltre l'evidenza, seppure quantitativamente non eclatante (11,7%), di ceppi con resistenza di tipo "high-level" verso la gentamicina, di particolare interesse perché si tratta di un'opzione tra le più importanti dal punto di vista della terapia delle infezioni nosocomiali: si tratta quasi esclusivamente di ceppi di *E. faecalis*, in sintonia con quanto rilevato da Busani et al. (2004), isolati quasi sempre da prodotti carnei. Per quanto riguarda un altro gruppo di antibiotici basilare in terapia umana, quello dei glicopeptidici, la percentuale di enterococchi resistenti è molto esigua, in analogia con quanto da noi evidenziato in un precedente lavoro (Pedonese et al., 2005).

Per quanto riguarda *E. durans*, l'esiguo numero di ceppi analizzati non permette di fornire considerazioni conclusive; in ogni caso questa specie non deve essere trascurata in indagini di questo tipo, vista l'evidenza di infezioni causate da enterococchi "non-*E. faecium*, non-*E. faecalis*", tra cui appunto *E. durans* (De Perio et al., 2006).

Resta infine da sottolineare la percentuale elevata di ceppi multiresistenti da noi rilevata, anche se, in sintonia con Peters et al. (2003), generalmente gli enterococchi in esame presentavano sensibilità nei confronti dei principi attivi che rappresentano le più importanti opzioni terapeutiche nelle infezioni enterococciche umane.

## BIBLIOGRAFIA

- BAUER A., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C., TURCK M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496.
- BUSANI L., DEL GROSSO M., PALADINI C., GRAZIANI C., PANTOSTI A., BIAVASCO F., CAPRIOLI A. (2004). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int. J. Food Microbiol.*, 97: 17-22.
- CITAK S., MENDI A., ORHAN S. (2005). Incidence, antibiotic resistance and some technological properties of *Enterococcus* species isolated from raw milk and white cheese samples. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 56 (4): 80-83.
- DE PERIO M.A., YARNOLD P.R., WARREN J., NOSKIN G.A. (2006). Risk factors and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 27 (1): 28-33.
- ELLERBROEK L., MAC K.N., PETERS J., HULTQUIST L. (2004). Hazard potential from antibiotic-resistant commensals like enterococci. *J. Vet. Med. B*, 51: 393-399.
- KÜHN I., IVERSEN A., BURMAN L.G., OLSSON-LILJEQUIST B., FRANKLIN A., FINN M., AARESTRUP F., SEYFARTH A.-M., BLANCH A.R., TAYLOR H., CAPLIN J., MORENO M.A., DOMINGUEZ L., MOLLBY R. (2000). Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the european research programme. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 14: 337-342.
- LOPES M.F.S., RIBEIRO T., ABRANTES M., MARQUES J.J.F., TENREIRO R., BARRETO CRESPO M.T. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 191-198.
- LUKASOVA J., SUSTACKOVA A. (2003). Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Vet. Brno*, 72: 315-323.
- MANNU L., PABA A., DAGA E., COMUNIAN R., ZANETTI S., DUPRÈ I., SECHI L.A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 291-304.
- MARTIN B., GARRIGA M., HUGAS M., AYMERICH T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1177-1190.
- PEDONESE F., INNOCENTI E., NUVOLONI R., SARTINI L., D'ASCENZI C., CERRI D., RINDI S. (2005). Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in foods of animal origin purchased in Tuscany. *Vet. Res. Comm.*, 29 (2): 347-349.
- PETERS J., MAC K., WICHMANN-SCHAUER H., KLEIN G., ELLERBROEK L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 311-314.
- SUSTACKOVA A., NAPRAVNIKOVA E., SCHLEGELOVA J. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiol.*, 49 (4): 411-417.