



UNIVERSITÀ DI PISA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN SANITÀ ANIMALE, ALLEVAMENTO E  
PRODUZIONI ZOOTECNICHE

**Studio di resistotipi di *Enterococcus* spp.  
isolati da galline ovaiole**

Specializzando

Dott.ssa Salvadori Claudia

Relatore

Dott.ssa Ebani Valentina Virginia

Correlatore

Dott.ssa Moni Annalisa

Anno Accademico 2013 - 2014

# INDICE

<b>Riassunto</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Enterococchi</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Antibiotico-resistenza</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Antibiotico-resistenza negli enterococchi</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Scopo della tesi</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>16</b>
<b>4. Risultati</b> .....	<b>21</b>
<b>5. Discussione</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Conclusioni</b> .....	<b>38</b>
<b>7. Bibliografia</b> .....	<b>39</b>
<b>Ringraziamenti</b> .....	<b>44</b>

## RIASSUNTO

**Parole chiave:** *enterococchi, antibiotico-resistenza, allevamento rurale, galline ovaiole, sanità pubblica*

Gli enterococchi (*Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*), considerati inizialmente come batteri ubiquitari, commensali della flora gastrointestinale dell'uomo e degli animali, sono emersi come importanti agenti di infezioni nosocomiali con spiccata capacità di acquisire antibiotico-resistenza, comportandosi anche da efficaci donatori di geni di resistenza. In questo studio, sono stati isolati 115 ceppi di *Enterococcus* spp. da tamponi cloacali di galline ovaiole di allevamenti rurali della provincia di Massa Carrara. Di questi ceppi è stato valutato il profilo di antibiotico-resistenza tramite antibiogramma (metodo Kirby-Bauer), valutazione della minima concentrazione inibente e determinazione della resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi (streptomicina e gentamicina). Questi ceppi sono risultati resistenti prevalentemente a: aminoglicosidi, eritromicina, fluorochinoloni, tetraciclina e nitrofurantoina. Numerosi ceppi (39,1%) sono risultati contemporaneamente resistenti a macrolidi, lincosamidi e streptogramina B. Moderata resistenza è stata osservata anche per linezolid (35,6%) e tigeciclina (26,1%). Le classi di resistenza sono risultate disomogenee, ma sono stati individuati 59 ceppi caratterizzati da multi-farmaco resistenza (*multi drug resistance*) e 10 ceppi con estesa antibiotico-resistenza (*extensive drug resistance*). La tipizzazione dei 69 resistotipi caratterizzati da diffusa antibiotico-resistenza, ha permesso di identificare 48 ceppi di *E. faecium* e 14 ceppi di *E. faecalis*. Gli allevamenti rurali di galline ovaiole possono quindi rappresentare un rischio per la sanità pubblica, quali serbatoi di enterococchi antibiotico-resistenti.

## ABSTRACT

**Keywords:** *enterococci, antimicrobial-resistance, rural farm, laying hens, public health*

Enterococci (*Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*) belong to the gastrointestinal flora of humans and animals and have become recognized as significant cause of nosocomial infections. Enterococci can acquire resistance to numerous antimicrobial agents, acting also as efficient donor of resistance genes. In this study, 115 strains of *Enterococcus* spp. have been isolated from cloacal swabs of laying hens of rural farms in the Massa Carrara province. Antibiotic-resistance has been evaluated with disc diffusion method, minimum inhibitory concentration and high-level aminoglycoside resistance. Isolated strains showed resistance mainly to: aminoglycosides, erythromycin, fluoroquinolones, tetracycline and nitrofurantoin. Numerous strains (39,1%) showed combined resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B. Moderate resistance have been also detected for linezolid and tigecycline. 59 strains have been classified as multidrug-resistant and 10 strains have been classified as extensively drug-resistant. Of them, 48 *E. faecium* and 14 *E. faecalis* have been identified. Rural laying hen farms could represent an hazard for public health as reservoir of antimicrobial-resistant enterococci.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 ENTEROCOCCHI

Precedentemente classificati nel genere *Streptococcus*, i batteri del genere *Enterococcus* sono cocchi Gram-positivi con antigene del gruppo D di Lancefield, non sporigeni, anaerobi facoltativi, chemiorganotrofi fermentanti, che appartengono al vasto gruppo dei microrganismi conosciuti come batteri lattici, così chiamati per la loro capacità di promuovere la fermentazione lattica. Ossidasi e catalasi negativi, anche se alcune specie producono pseudocatalasi, gli enterococchi hanno un aspetto sferico o ovoidale con dimensioni di 0,6-2,5µm e si presentano singolarmente, in coppie o corte catene. Gli enterococchi crescono ad un optimum di temperatura di 35°C, ma la maggior parte delle specie può crescere a temperature che vanno da 10 a 45°C e sopravvivere al riscaldamento di 60°C per 30 minuti. Sono in grado di idrolizzare l'esculina in presenza di sali biliari e di crescere con concentrazioni fino a 6,5% di NaCl e con pH alcalini (9,6), tollerando però, anche pH molto bassi fino a 3,6 (la maggior parte delle specie cresce a un pH di 4-4,5) (Domig *et al.*, 2003; Byappanahalli *et al.*, 2012). Attualmente nel genere *Enterococcus* sono comprese circa 36 specie (vedi tab.1). Generalmente non provocano emolisi, raramente mostrano  $\alpha$ -emolisi. La motilità differisce tra le varie specie: ad esempio *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* sono mobili mentre *E. asini* e *E. phoeniculicola* non lo sono. Anche la pigmentazione differisce tra le varie specie, ad esempio *E. sulfureus*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii* sono caratterizzate da una pigmentazione gialla. La presenza di pigmentazione è comunque tipica degli enterococchi che si ritrovano sulle piante (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Per la loro capacità di crescere e sopravvivere in condizioni avverse, gli enterococchi sono largamente diffusi nell'ambiente. Si possono ritrovare nel terreno (sia in zone temperate che tropicali), nella sabbia e nei sedimenti marini, nell'acqua dolce e marina o sulla vegetazione sia acquatica che marina. Il loro habitat naturale è però rappresentato dal tratto gastrointestinale di uomini e animali compresi gli insetti, rappresentando importanti membri della normale microflora commensale intestinale. Probabilmente la loro ubiquitaria presenza nell'ambiente è dovuta alla contaminazione a partire da tale habitat naturale. La loro presenza è infatti un ottimo indicatore di inquinamento ambientale che determina la non potabilità dell'acqua (Domig *et al.*, 2003; Byappanahalli *et al.*, 2012).

Gruppo	Specie	Habitat	Patogenicità uomo
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Uomo, animali (numerosi, anche insetti), piante	Sì
	<i>E. haemoperoxidus</i>	Acqua di superficie	
	<i>E. moraviensis</i>	Acqua di superficie	
	<i>E. silesiacus</i>	Acqua potabile	
	<i>E. termitis</i>	Animali (termiti)	
	<i>E. caccae</i>	Uomo	
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Uomo, animali (numerosi, anche insetti), piante	Sì
	<i>E. durans</i>	Uomo, animali (numerosi, anche insetti)	Sì
	<i>E. hirae</i>	Animali (numerosi, anche insetti), piante	
	<i>E. mundtii</i>	Terreno, piante	Sì
	<i>E. villorum</i>	Animali (suino)	
	<i>E. canis</i>	Animali (cane)	
	<i>E. ratti</i>	Animali (ratto)	
	<i>E. asini</i>	Animali (scimmia)	
	<i>E. phoeniculicola</i>	Animali (uccelli)	
	<i>E. canintestini</i>	Animali (cane)	
	<i>E. thailandicus</i>	Uomo, animali (bovino)	
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	Uomo, animali (numerosi)	Sì
	<i>E. pseudoavium</i>	Uomo	
	<i>E. malodoratus</i>	Animali (bovino)	
	<i>E. raffinosus</i>	Uomo	Sì
	<i>E. gilvus</i>	Uomo	
	<i>E. pallens</i>	Uomo	
	<i>E. hermannienseis</i>	Animali (cane)	
	<i>E. devriesei</i>	Animali (bovino)	
	<i>E. viikkiensis</i>	Animali (pollo), piante	
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>	Uomo, animali (numerosi, anche insetti)	Sì
	<i>E. casseliflavus</i>	Terreno, piante, uomo, animali (numerosi)	Sì
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i>	Animali (pollo)	
	<i>E. columbae</i>	Animali (piccione)	
<i>Ungrouped</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	Animali (bovino)	
	<i>E. aquimarinus</i>	Acqua di mare	
	<i>E. sulfureus</i>	Piante	
	<i>E. dispar</i>	Uomo	
	<i>E. italicus</i>	Animali (bovino)	
	<i>E. camelliae</i>	Piante	

**Tabella 1. Specie riconosciute del genere *Enterococcus* e il loro habitat (Modificata da Byappanahalli et al., 2012)**

Gli enterococchi hanno importanti proprietà funzionali quale ad esempio quella di favorire la maturazione dei formaggi, probabilmente grazie alle loro capacità proteolitiche, lipolitiche e al metabolismo del citrato, contribuendo al loro aroma. Gli enterococchi sono comunque rinvenibili anche in altri prodotti alimentari fermentati come salsicce e olive (Domig *et al.*, 2003). Gli enterococchi hanno anche la capacità di produrre batteriocine, chiamate enterocine, piccoli peptidi ad attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi, come ad esempio *Listeria*. L'esistenza di ceppi produttori di batteriocine nella flora simbiotica (come ad esempio anche nella ghiandola uropigiale degli uccelli) riduce il rischio

di infezione da parte di batteri patogeni (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2013). Gli enterococchi possono essere inoltre utilizzati come probiotici per promuovere la funzionalità intestinale, contrastare la diarrea e favorire la risposta immunitaria (Domig *et al.*, 2003).

Nell'uomo gli enterococchi sono riconosciuti come agenti eziologici di infezioni nosocomiali e/o acquisite dalla comunità quali: infezioni del tratto urinario, infezioni di ferite, infezioni neonatali, sepsi ed endocarditi (Hammerum *et al.*, 2010). Le specie clinicamente più importanti in medicina umana sono *E. faecalis* e *E. faecium*. Di queste, *E. faecalis* rappresenta la specie più patogena, ma *E. faecium* sta assumendo una crescente importanza in quanto più frequentemente mostra resistenza agli antibiotici (Nilsson, 2012). Anche negli animali gli enterococchi sono agenti di malattia, quale principalmente mastiti nella bovina, diarrea nel bovino e nel suino e endocardite, spondilite e setticemia nel pollame (Robbins *et al.*, 2012; Šeputienė *et al.*, 2012). *E. faecalis* è stato anche recentemente riconosciuto quale agente di artropatia amiloide nelle pollastre. Negli animali da laboratorio, gli enterococchi, determinano infezioni del tratto urinario ed endocarditi simili a quelle riscontrate nell'uomo ed è stato possibile dimostrare un'interazione sinergica di virulenza tra *E. faecalis* e altri batteri (Singh *et al.*, 2009; Šeputienė *et al.*, 2012).

Trattandosi di commensali intestinali, gli enterococchi tendono a sviluppare una equilibrata convivenza con l'ospite. Alterazioni di questo equilibrio possono manifestarsi sia per motivi legati all'ospite che al microrganismo. Per quanto riguarda l'ospite, trattamenti antibiotici prolungati contro Gram-negativi e Gram-positivi portano ad alterazioni della composizione della flora microbica e la prima fase delle infezioni da enterococchi è proprio un aumento della densità di colonizzazione del tratto gastrointestinale (Arias and Murray, 2013; Hammerum *et al.*, 2010). In particolare, è stato dimostrato che il liposaccaride e la flagellina dei batteri Gram-negativi, inclusi gli anaerobi, stimolano la produzione di REGIII $\gamma$  da parte delle cellule di Paneth (attraverso l'interazione con i recettori *Toll-like*). REGIII $\gamma$  è una lectina con attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi, inclusi gli enterococchi antibiotico-resistenti. Una diminuzione della popolazione di Gram-negativi a causa di trattamenti antibiotici, diminuisce la produzione di REGIII $\gamma$ , facilitando la colonizzazione da parte degli enterococchi antibiotico-resistenti che diventano poi, la specie intestinale predominante e rimanendo tale anche dopo 2 mesi che il trattamento antibiotico è stato interrotto (Arias and Murray, 2013). Per quanto riguarda fattori legati alle caratteristiche del microrganismo, gli enterococchi sono relativamente meno dotati in termini di virulenza se confrontati con altri cocci Gram-positivi, come streptococchi e stafilococchi. Si riconoscono comunque importanti fattori di virulenza quali ad esempio:

- fattori di secrezione: emolisina-citolisina, gelatinasi e serina-proteinasi extracellulare;
- proteine di superficie: esempio, i pili, strutture filamentose che protrudono dalla superficie cellulare importanti per la produzione del biofilm; le proteine della famiglia delle *aggregation substance proteins*, le proteine appartenenti alle *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* importanti nelle prime fasi dell'infezione in quanto utili all'ancoraggio alla matrice extracellulare dell'ospite e i polisaccaridi, importanti componenti della superficie cellulare che permettono l'evasione della fagocitosi e determinano la stimolazione della produzione di citochine (Arias and Murray, 2013; Šepútiènė *et al.*, 2012; Gilmore *et al.*, 2013).

Importante notare che l'identificazione dei geni che codificano per fattori di virulenza non è necessariamente legata all'espressione fenotipica di tali fattori, infatti possono essere identificati in ceppi responsabili di malattia così come in ceppi isolati da individui sani (Diarra *et al.*, 2010; Arias and Murray, 2013). La presenza dei geni di virulenza è inoltre variabile nelle diverse specie di enterococchi, ad esempio in uno studio condotto su ceppi isolati da broiler, il maggior numero di geni di virulenza e la maggiore attività gelatinasica è stata riscontrata per *E. faecalis* (Diarra *et al.*, 2010).

## 1.2 ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Dal primo utilizzo degli antibiotici nel 1930, lo sviluppo di farmaci efficaci per il trattamento delle infezioni batteriche ha rivoluzionato la terapia in medicina umana così come in medicina veterinaria riducendo drasticamente la morbilità e la mortalità associate a tali patologie. Sfortunatamente però, lo sviluppo di farmaci antibatterici efficaci è stato seguito dall'insorgenza di organismi farmaco-resistenti. L'antibiotico-resistenza è definita come la capacità posseduta da alcune specie batteriche di sopravvivere e moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di antibiotico in grado di inibire o uccidere microrganismi appartenenti alla stessa specie (Rang *et al.*, 2008).

L'antibiotico resistenza è considerata oggi un problema di estrema importanza nell'ambito della sanità pubblica, che limita o rende meno efficaci le opzioni di trattamento diminuendo nel contempo la qualità della vita (circa 25000 persone all'anno in Europa muoiono per infezioni da batteri multi resistenti) oltre a comportare un grave impatto economico in termini di aumento dei costi dell'assistenza sanitaria e perdite di produttività (circa 1,5 miliardi di euro all'anno) (Norrby *et al.*, 2009). Lo sviluppo di antibiotico resistenza è strettamente correlato all'inappropriato utilizzo degli antimicrobici sia in medicina umana che veterinaria: l'uso eccessivo e scorretto di antibiotici, insieme alla scarsa igiene e alle carenze nelle pratiche di

controllo delle infezioni, crea condizioni favorevoli allo sviluppo, alla diffusione e alla persistenza di microrganismi resistenti sia nell'uomo che negli animali.

I meccanismi biochimici di resistenza agli antibiotici sono di diverso tipo. Si riconoscono (Harbottle *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2008):

- Produzione di un enzima che inattiva il farmaco (l'esempio classico è la resistenza causata da inattivazione degli antibiotici  $\beta$ -lattamici per presenza dell'enzima  $\beta$ -lattamasi che rompe l'anello  $\beta$ -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine);
- Alterazione dei siti sensibili ai farmaci o dei siti di legame dei farmaci (ad esempio i siti di legame degli aminoglicosidi sulla subunità 30S del ribosoma possono essere alterati da una mutazione cromosomica oppure mutazioni dei geni codificanti la DNA girasi e la topoisomerasi possono alterare l'efficacia del legame dei fluorochinoloni riducendone l'efficacia);
- Diminuito accumulo del farmaco nel batterio per diminuita permeabilità della cellula batterica (ad esempio attraverso alterazione delle porine nei Gram-negativi) o per meccanismi di efflusso attivo della molecola fuori dalla cellula batterica (ad esempio nel caso della resistenza alle tetracicline, i geni della resistenza codificano per delle proteine inducibili nella membrana del batterio che promuovono l'espulsione energia-dipendente delle tetracicline);
- Sviluppo di una via metabolica alternativa alla reazione inibita dall'antibiotico (ad esempio la resistenza al trimethoprim è dovuta alla sintesi, plasmide-dipendente, di una diidrofolato reductasi con affinità bassa o nulla per il farmaco).

Per quanto riguarda i meccanismi di acquisizione dell'antibiotico-resistenza si distinguono:

1. *Resistenza naturale intrinseca*: si tratta di una resistenza di specie, cioè che riguarda tutti i ceppi di una stessa specie, è immutabile nel tempo e conseguente al normale assetto genetico. Esempi di resistenza intrinseca sono l'insensibilità degli enterobatteri per le penicilline o dei batteri Gram-negativi per i glicopeptidi.
2. *Resistenza acquisita cromosomica (o endogena)*: si tratta di resistenza che viene acquisita a seguito di una mutazione cromosomica spontanea che normalmente avviene nelle popolazioni batteriche. Si riconosce una resistenza cromosomica *multi-step*, per la quale sono necessarie più mutazioni perché possa instaurarsi (come ad esempio per i beta-lattamici, macrolidi e cloramfenicolo) e una di tipo *one-step*, in cui è sufficiente una sola mutazione per determinare la comparsa di ceppi totalmente resistenti (ad esempio per i chinoloni). L'utilizzo

di antibiotici esercita un'azione selettiva in quanto, qualora il batterio divenuto resistente a causa della mutazione venga sottoposto a una pressione selettiva medicamentosa, esso si moltiplicherà e sostituirà progressivamente i ceppi sensibili all'azione del farmaco. Questo tipo di resistenza si trasmette verticalmente alla discendenza batterica e rappresenta il 10-15% delle resistenze acquisite.

3. *Resistenza acquisita extra-cromosomica (o esogena)*: costituisce l'85-90% delle resistenze acquisite e consiste nel trasferimento di geni di resistenza tra elementi genetici all'interno del batterio stesso o per trasferimento dei geni della resistenza tra cellule batteriche diverse. Il trasferimento dei geni di resistenza tra batteri della stessa specie o di specie diverse, ed anche tra batteri Gram-positivi e Gram-negativi, è di fondamentale importanza nella diffusione della resistenza agli antibiotici e può avvenire per *coniugazione*, *trasduzione* e *trasformazione* (Gyles and Boerlin, 2014). Il meccanismo più importante è per *coniugazione* che consiste in un contatto cellula-cellula durante il quale il DNA cromosomiale, o quello extracromosomiale, viene trasferito da un batterio all'altro. La *coniugazione* rappresenta la modalità di trasferimento della resistenza più significativo nelle popolazioni di batteri normalmente presenti ad alta densità, come quelli della flora intestinale. La *trasduzione* è un processo tramite il quale il DNA plasmidico viene inserito in un virus batterico (o batteriofago) e trasferito a un altro batterio della stessa specie. È un meccanismo di trasferimento di materiale genetico abbastanza inefficiente, ma clinicamente importante nel trasferimento di geni responsabili della resistenza tra ceppi diversi di stafilococchi e streptococchi. La *trasformazione* consiste invece, nell'acquisizione di DNA dall'ambiente dopo averlo incorporato nel genoma attraverso ricombinazione omologa, ma non sembra essere un meccanismo importante per la diffusione della resistenza (Gyles and Boerlin, 2014; Rang *et al.*, 2008).

Oltre ai cromosomi, molte specie batteriche possiedono elementi genetici extracromosomiali, chiamati plasmidi, che si trovano nel citoplasma, in grado di replicarsi in modo indipendente. I plasmidi che portano i geni per la resistenza agli antibiotici (geni *r*) sono detti plasmidi *R* e possono essere trasferiti tramite coniugazione da una cellula donatrice a una cellula batterica ricevente. Il plasmide può quindi integrarsi nel cromosoma o rimanere nel citoplasma oppure può scambiare sequenze di inserzione o trasposoni con altri plasmidi. Infatti, oltre a trasportare geni di resistenza, i plasmidi possono essere veicoli di altri elementi di resistenza, come trasposoni e integroni. I trasposoni sono sequenze geniche che possono muoversi da una localizzazione cromosomica ad un'altra, o tra un cromosoma e un plasmide. I trasposoni sono composti da sequenze di inserzione laterali, un segmento di DNA compreso tra queste, e

dall'enzima responsabile per la trasposizione, la trasposasi. I trasposoni possono trasferire uno o più geni della resistenza e a loro volta possono raggiungere una diversa specie batterica integrandosi nei suoi plasmidi (anche se il plasmide non è in grado di replicare in un nuovo ospite, il trasposone può integrarsi nel cromosoma del nuovo ospite o in un suo plasmide). La resistenza, in particolare la resistenza multifarmacologica, può anche essere diffusa da un altro elemento mobile, l'integrone. L'integrone è un elemento genetico mobile con una specifica struttura caratterizzata da due regioni laterali conservate, all'interno delle quali può essere integrato il cosiddetto *gene cassetta* ("gene cassettes"), anche sottoforma di *sistemi multi-cassette* (*multiple gene cassettes*) che permettono un trasferimento particolarmente rapido ed efficace della resistenza multifarmacologica tra elementi genetici, sia all'interno dello stesso batterio, sia tra batteri diversi (Harbottle *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2008).

### 1.3 ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEGLI ENTEROCOCCHI

Gli enterococchi sono caratterizzati da una spiccata plasticità genomica che deriva dalla loro capacità di acquisire geni utili in seguito a trasferimento genico orizzontale e ricombinazione, ma anche a mutazioni e alla capacità di selezionare ed espandere i complessi clonali più vantaggiosi. Sono quindi batteri straordinariamente dotati in termini di capacità di acquisire e sviluppare antibiotico-resistenze comportandosi da efficienti donatori di materiale genetico (Palmer *et al.*, 2010). La teoria più probabile per spiegare come gli enterococchi possano aver assunto caratteri di resistenza prevede che inizialmente gli enterococchi quali colonizzatori dell'intestino di insetti (e potenzialmente anche di altri componenti della fauna del suolo come i nematodi), siano stati continuamente esposti a molecole ad azione antibiotica e a geni di resistenza di organismi produttori di tali molecole, coresidenti nella materia organica nel contesto della quale gli insetti si nutrono. Gli enterococchi degli insetti si sono quindi integrati con quelli dei rettili, uccelli e mammiferi seguendo la catena alimentare, e creando una forte connessione tra la resistenza nel terreno e i ceppi antibiotico-resistenti adattati ai mammiferi. L'ampio utilizzo degli antibiotici in medicina e in agricoltura negli ultimi 60 anni ha poi selezionato ulteriormente ceppi ad alta antibiotico-resistenza (Gilmore *et al.*, 2013). Come descritto precedentemente, anche per gli enterococchi si riconosce sia un'antibiotico-resistenza intrinseca e sia una di tipo acquisita.

#### *Resistenza intrinseca*

$\beta$ -lattamici e cefalosporine. La sviluppo della maggior parte dei batteri dipende dal legame enzimatico del precursore pentapeptidico alla molecola di peptidoglicano della parete

cellulare. Gli enzimi responsabili di tale legame sono dette “*penicillin binding proteins*” (PBPs). Il legame dei  $\beta$ -lattamici alle PBPs porta ad un blocco della sintesi della parete. Gli enterococchi esprimono PBPs a bassa affinità (PBP5 in *E. faecium* e PBP4 in *E. faecalis*) che legano debolmente i composti  $\beta$ -lattamici (Hollenbeck and Rice, 2012; Arias and Murray, 2013).

Aminoglicosidi. Sia *E. faecium* che *E. faecalis* sono intrinsecamente resistenti alle concentrazioni clinicamente raggiungibili di aminoglicosidi. Per *E. faecalis* il maggior grado di resistenza è per la streptomina (con una MIC fino a 500  $\mu\text{g/ml}$ ) e sembra dovuta a l'impossibilità per l'aminoglicoside di entrare nella cellula, dove andrebbe ad inibire la sintesi proteica ribosomiale. La combinazione tra aminoglicosidi e agenti attivi contro la parete cellulare è in grado comunque di determinare un effetto battericida (sinergismo). Alcuni enterococchi esprimono però enzimi codificati a livello cromosomico che incrementano la MIC degli aminoglicosidi e prevengono il sinergismo. Caratteristico di *E. faecium* è ad esempio l'enzima 6'-acetiltransferasi che conferisce resistenza alla tobramicina (con una MIC fino a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) e alla kanamicina (Hollenbeck and Rice, 2012).

Lincosamidi e Streptogramine. *E. faecalis* è intrinsecamente resistente alla clindamicina (lincosamide), alla quinupristina (streptogramina classe B) e alla dalfopristina (streptogramina classe A) a causa di una escrezione attiva dei farmaci per effetto delle “*ATP-binding cassette (ABC)-efflux pumps*” (Hollenbeck and Rice, 2012; Arias and Murray, 2013).

Trimethoprim-sulfametazolo. La maggior parte dei batteri sono incapaci di utilizzare il folato dell'ambiente, pertanto sono dipendenti da una sintesi ex-novo per poter produrre acidi nucleici. La combinazione antibiotica trimethoprim-sulfametazolo inibisce due passaggi sequenziali nella via di sintesi del tetraidrofolato determinando un effetto battericida ad ampio spettro. Gli enterococchi sono invece in grado di assorbire acido folico dall'ambiente e pertanto risultano insensibili all'azione del trimethoprim-sulfametazolo (Hollenbeck and Rice, 2012).

### *Resistenza acquisita*

L'acquisizione di antibiotico-resistenza può avvenire o per mutazione spontanea o per trasmissione orizzontale di materiale genetico mobile. I plasmidi sono particolarmente abbondanti negli enterococchi. Si riconoscono plasmidi *pheromone-responsive*, descritti principalmente in *E. faecalis*, che permettono il trasferimento di materiale genetico con un meccanismo altamente efficiente, ma ristretto a questa specie, così come plasmidi di

coniugazione ad ampio spettro, non *pheromone-responsive*, in grado di diffondere geni di resistenza anche a specie batteriche diverse. I trasposoni responsabili del maggior trasferimento di geni sono quelli della famiglia Tn3 (tra i quali il Tn917 che conferisce resistenza per macrolidi, lincosamidi e streptogramina B), i trasposoni di coniugazione (tra i quali il Tn916 che conferisce resistenza alla minociclina e alla tetraciclina) e i trasposoni composti (Palmer *et al.*, 2010; Hegstad *et al.*, 2010).

$\beta$ -lattamici. Gli enterococchi possono acquisire una incrementata resistenza alle penicilline attraverso l'acquisizione di  $\beta$ -lattamasi o per mutazioni delle PBP 4/5 (Hollenbeck and Rice, 2012).

Aminoglicosidi. L'acquisizione di elementi genetici mobili conferisce una resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi sia in *E. faecium* che in *E. faecalis*. La resistenza ad alti livelli per la gentamicina avviene per l'acquisizione di un gene che codifica per un enzima (*aminoglycoside-modifying enzyme AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia*) che disattiva la molecola tramite fosforilazione e acetilazione determinando resistenza a tutti gli aminoglicosidi eccetto per la streptomina. L'antibiotico infatti, così modificato, non è più in grado di legarsi al suo target sulla subunità ribosomiale 30S. La resistenza ad alti livelli di streptomina avviene attraverso modificazione enzimatica dell'antibiotico da ceppi produttori di streptomina-adeniltransferasi o per singola mutazione puntiforme del ribosoma (Hollenbeck and Rice, 2012).

Glicopeptidi. La maggior parte delle infezioni da enterococchi glicopeptidi-resistenti sono causate da *E. faecium*, ma la resistenza è espressa anche da *E. faecalis* e altri enterococchi. La vancomicina è prodotta da *Streptomyces orientalis*, batterio del terreno (Nilsson, 2012). La resistenza alla vancomicina è comune in natura, infatti, numerosi membri di generi di batteri Gram-positivi, come *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, e *Pediococcus* sono intrinsecamente resistenti ai glicopeptidi producendo un precursore a bassa affinità per la vancomicina. Un simile pattern di resistenza intrinseca è presente anche in *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. L'origine di geni responsabili della resistenza ad alti livelli di vancomicina negli enterococchi è stata attribuita a batteri ambientali appartenenti al genere *Paenibacillus* spp. (Arias e Murray, 2013). La vancomicina agisce legandosi al terminale D-ala-D-ala del precursore pentapeptidico inibendo quindi la sintesi della parete cellulare. La resistenza alla vancomicina è dovuta all'acquisizione di vari operoni denominati vanA, vanB (che sono i più comuni), vanD, vanE, vanG, vanL, a vanN codificanti per i rispettivi pattern fenotipici. Il genotipo vanC è intrinseco per *E. gallinarum* ed *E. casseliflavus*. I batteri glicopeptide-resistenti

modificano il precursore sostituendo il terminale D-ala con D-lac (vanA, vanB e vanD) o D-ser (van, vanE, vanG, vanL e probabilmente and vanN), rendendolo rispettivamente circa 1000 volte e 6 volte meno affine per il legame con i glicopeptidi (Hegstad *et al.*, 2010). Il trasferimento orizzontale dei geni *van* avviene attraverso molteplici meccanismi. Ad esempio, il gene *vanA* è mobilizzato su un trasposone della famiglia Tn3, il Tn1546. Quest'ultimo si ritrova sia su plasmidi coniugativi che su plasmidi non coniugativi (Arias and Murray, 2013). I plasmidi del gruppo di incompatibilità 18 (*incompatibility group*, Inc.18) sono plasmidi coniugativi ad ampio spettro, particolarmente abbondanti in *E. faecium* e sono implicati nel trasferimento di *vanA* a ceppi di *Streptococcus aureus* meticillina-resistenti. Una completa resistenza ai glicopeptidi richiede però anche l'eliminazione del normale precursore grazie alla presenza di dipeptidasi e carbossipeptidasi (Arias and Murray, 2013; Palmer *et al.*, 2010).

Quinupristina-dalfopristina. Composto da due streptogramine semisintetiche, questo antibiotico agisce inibendo la sintesi proteica interagendo con la subunità ribosomiale 50S. *E. faecalis* è intrinsecamente resistente e quindi la maggior parte dei geni caratterizzati da trasferimento orizzontale sono stati isolati da *E. faecium*. Tre sono i meccanismi con cui gli elementi genetici acquisiti causano resistenza alla streptogramina: acetilazione dell'antibiotico, aumentato efflusso dell'antibiotico e metilazione del sito bersaglio 23S dell'rRNA.

Linezolid. Questo oxazolidinone è un batteriostatico che inibisce la sintesi proteica interferendo con il posizionamento dello aminoacil-tRNA al sito A del ribosoma. È utilizzato per trattare infezioni da enterococchi vancomicina-resistenti. Il più comune meccanismo di resistenza identificato negli enterococchi è una mutazione (G2576T) che interferisce con il normale posizionamento di nucleotidi cruciali nel sito di legame per il linezolid (Arias and Murray, 2013).

Tigeciclina. È un antibiotico (glicilciclina) di recente sintesi utilizzato per trattare infezioni da enterococchi vancomicina resistenti. Il meccanismo di resistenza alla tigeciclina negli enterococchi è ancora sconosciuto (Hegstad *et al.*, 2010; Hollenbeck and Rice, 2012).

Gli enterococchi risultano comunemente resistenti anche a macrolidi, tetracicline, cloramfenicolo, fosfomicina, rifampicina e chinoloni, tanto che queste molecole non vengono più utilizzate per trattare infezioni enterococciche dell'uomo (Hollenbeck and Rice, 2012;

Diarra *et al.*, 2010). La resistenza alle tetracicline è mediata dai geni *tetL*, *tetM*, *tetO* e *tetS* generalmente trasferiti mediante trasposoni coniugativi (Hegstad *et al.*, 2010) e plasmidi *pheromone-responsive* (Palmer *et al.*, 2010). La resistenza ai macrolidi (eritromicina) è mediata dai geni *erm*, responsabili della resistenza anche verso lincosamidi, streptogramina B e quinopristina (MLS<sub>B</sub>). Tali geni codificano per l'enzima metilasi che metila l'RNA 23S (Diarra *et al.*, 2010). In particolare il gene *ermB* può essere trasportato da trasposoni della famiglia Tn3 o dal trasposone composito, Tn5385, unitamente a geni di resistenza per tetraciclina-minociclina (*tetM*), penicillina, streptomina e altri aminoglicosidi ad alti livelli (Hegstad *et al.*, 2010).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è quello di caratterizzare l'antibiotico-resistenza in enterococchi isolati da tamponi cloacali di galline ovaiole di allevamenti rurali della provincia di Massa Carrara. In particolare, sarà studiata l'espressione fenotipica di resistenza con:

1. antibiogramma (test Kirby-Bayer) con l'utilizzo di 21 molecole quali: rifampicina, cloramfenicolo, linezolid, nitrofurantoina, trimethoprim, neomicina, gentamicina, streptomicina, cefalotina, ciprofloxacina, enrofloxacin, teicoplanina, vancomicina, eritromicina, quinupristin/dalfopristin, clindamicina, oxacillina, amoxicillina con acido clavulanico, ampicillina, tetraciclina e tigeciclina.
2. valutazione della minima concentrazione inibente (MIC) per ampicillina e vancomicina;
3. valutazione della resistenza ad alti livelli di gentamicina e streptomicina.

I risultati di tali indagini saranno quindi utilizzate per determinare le classi di resistenza e di conseguenza una classificazione in ceppi multi-farmaco resistenti (*multi drug resistant*, MDR), ceppi estesamente resistenti (*extensive drug resistant*, XDR) ed eventualmente ceppi pan resistenti (*pandrug resistant*, PDR). I ceppi caratterizzati da diffusa antibiotico-resistenza saranno identificati mediante API 20 Strep.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 1. Isolamento e conservazione ceppi batterici

Nel periodo compreso tra marzo 2013 e novembre 2013, sono stati effettuati 157 tamponi cloacali di galline ovaiole in allevamenti rurali della provincia di Massa Carrara (comuni di Massa, Carrara, Montignoso, Fosdinovo) grazie alla collaborazione della U.O.C. Sanità Animale, Dipartimento di Prevenzione, Azienda USL Massa Carrara (Dott.ssa Annalisa Moni, Dott. Armando Tognoni). Gli allevamenti, di piccole dimensioni (da 10 a 70 soggetti), erano a conduzione ed uso familiare, con animali allevati a terra, in recinti o liberi in giardini o piccoli appezzamenti di terreno. Gli animali al momento del prelievo, non mostravano sintomi clinici di malattie e non erano sottoposti a trattamenti farmacologici. I prelievi sono stati effettuati per cattura casuale degli animali, utilizzando tamponi sterili con terreno di trasporto (*transport swabs*, Copan Innovation, Italia).

L'isolamento degli enterococchi è stato effettuato con semina diretta dei tamponi su piastre di Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAAA, Oxoid), incubate a 42°C per 24 ore. Le colonie di colore marrone con formazione di precipitato nero sul terreno sono state prelevate e seminate nuovamente su KAAA per ottenere colture pure. Gli isolati sono stati quindi conservati alla temperatura di -80°C in BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) con aggiunta di glicerolo sterile.

#### 2. Screening di valutazione dell'enzima arginina-decarbossilasi (ADH)

Per differenziare ceppi di *Enterococcus* spp. da *Aerococcus* spp., è stata effettuata la prova biochimica per la valutazione dell'enzima arginina-decarbossilasi (ADH). A questo riguardo sono stati utilizzati due tubi per ogni ceppo in esame, contenenti rispettivamente brodo Decarboxylase Base Moeller (Difco, USA) con e senza aggiunta di Arginina 1%. In ogni tubo è stato aggiunto il ceppo in esame, stemperato in soluzione fisiologica. I tubi sono stati messi ad incubare a 37°C per 24 ore. Quando il ceppo da caratterizzare viene aggiunto al brodo, comincia a fermentare il destrosio presente, e la produzione di acidi abbassa il pH facendo variare l'indicatore da porpora a giallo. La condizione di acidità attiva le decarbossilasi. Se il ceppo possiede l'enzima arginina-decarbossilasi, l'aminoacido viene degradato fino alla corrispondente amina. L'arginina viene prima idrolizzata a ornitina, e questa a sua volta viene decarbossilata fino a putrescina. La produzione di queste amine fa innalzare il pH, facendo cambiare il colore dell'indicatore da giallo a viola-porpora. Se il ceppo non possiede l'enzima specifico, il medium rimane acido, con colorazione gialla. I

ceppi con reazione positiva (colorazione viola) alla prova con Decarboxylase Base Moeller con Arginina (e colorazione gialla del brodo Decarboxylase Base Moeller senza arginina) sono stati classificati come *Enterococcus* spp.

### 3. Determinazione della sensibilità in vitro agli antibiotici

#### a. Kirby-Bauer test

Il pattern di sensibilità agli antimicrobici è stato determinato secondo il “*disc diffusion method*” (metodo Kirby-Bauer test) (Bauer *et al.*, 1966) su piastre di Mueller Hinton Agar (Oxoid), con l’utilizzo di 21 antimicrobici (Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Oxoid) (tabella 2) e incubazione a 37°C per 24 ore. I diametri degli aloni di inibizione ottenuti sono stati interpretati secondo le indicazioni fornite dal produttore e i criteri interpretativi suggeriti dal CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) per *Enterococcus* spp. (tabella 2).

Classe Antibiotico	Antibiotico	Concentrazione µg	Criteri interpretativi aloni di inibizione		
			Resistente	Intermedio	Sensibile
Altro	Rifampicina (RD)	30	≤16	17-19	≥20
	Cloramfenicolo (C)	30	≤12	13-17	≥18
	Linezolid (LZD)	30	≤20	21-22	≥23
	Nitrofurantoina (F)	300	≤14	13-16	≥17
	Trimethoprim (W)	5	<21		>50
Aminoglicosidi	Neomicina (N)	10	≤12	13-16	≥17
	Gentamicina (CN)	10	≤12	13-14	≥15
	Streptomina (S)	10	≤11	12-14	≥15
Cefalosporine	Cefalotina (KF)	30	≤14	15-17	≥18
Fluorochinoloni	Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16-20	≥21
	Enrofloxacin (ENR)	5	≤17	18-21	≥22
Glicopeptidi	Teicoplanina (TEC)	30	≤10	11-13	≥14
	Vancomicina (VA)	30	<14	14-15	>16
Macrolidi	Eritromicina (E)	10	≤13	14-22	≥23
Streptogramine	Quinupristin/Dalfopristin (QD)	15	≤15	16-18	≥19
Lincosamidi	Clindamicina (DA)	2	≤14	15-20	≥21
Penicilline	Oxacillina (OX)	1	≤10	11-12	≥13
	Amoxicillina + Acido Clavulanico (AMC)	30	≤13	14-17	≥18
	Ampicillina (AMP)	10	≤16		≥17
Tetracicline	Tetraciclina (TE)	30	≤14	15-18	≥19
	Tigeciclina (TGC)	15	≤15	16-17	≥18

**Tabella 2. Antibiotici e criteri interpretativi utilizzati per il Kirby-Bauer test**

*b. Minima concentrazione inibente (MIC)*

La MIC è la minima concentrazione di antibiotico in grado di impedire lo sviluppo di un batterio. In questo studio, è stato utilizzato il metodo per diluizione in terreno liquido con micropiastre da 96 pozzetti (micrometodo).

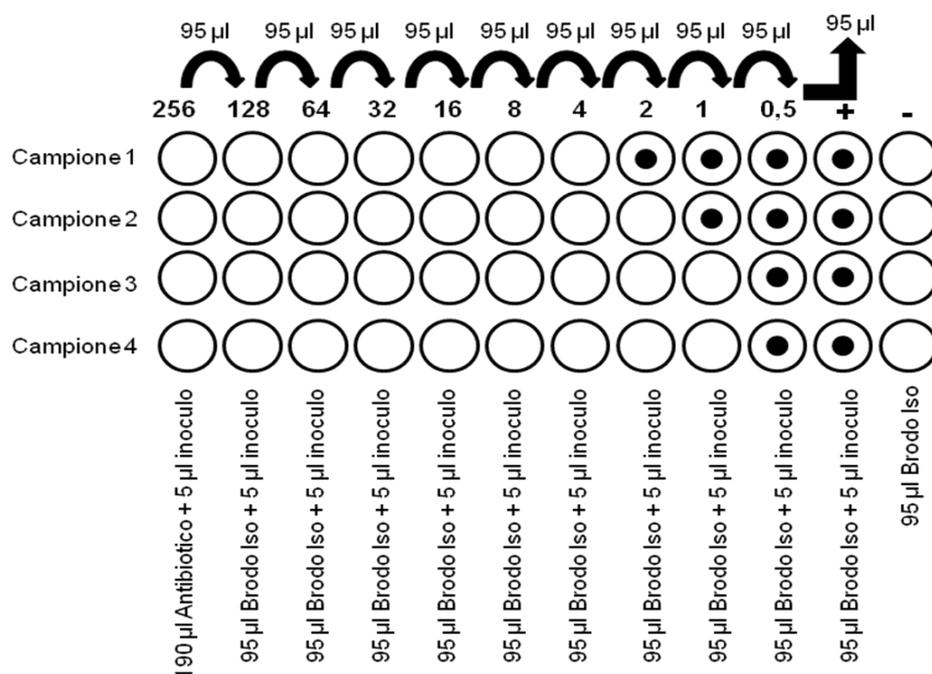
*Preparazione dei ceppi.* Sono state prelevate con ansa le colture pure da KAAA e stemperate in 5 ml di brodo Iso-Sensitest (Oxoid); successivamente è stato preparato l'inoculo aggiungendo 0,1 ml di questa sospensione a 2 ml di brodo Iso-Sensitest sterile.

*Diluizioni.* Per la vancomicina sono state utilizzate le diluizioni; 0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256 mg/L; mentre per l'ampicillina sono state utilizzate le diluizioni 8-16-32-64-128-256 mg/L (vedi Fig. 1).

In tutti i pozzetti, ad eccezione di quelli a maggiore concentrazione di antibiotico (256 mg/L), vengono messi 95µl di brodo; dopodiché 190 µl di antibiotico diluito 1:10 con brodo Iso-Sensitest vengono messi nella fila dei pozzetti a concentrazione più alta. Da questi pozzetti vengono quindi prelevati 95 µl della soluzione ottenuta e posti nella successiva fila di pozzetti, analogamente 95 µl di questa soluzione viene aggiunta ai pozzetti della terza fila e così via. I 95 µl prelevati dall'ultima fila di pozzetti, a concentrazione più bassa, vengono eliminati. Infine, vengono aggiunti 5 µl di inoculo batterico in ogni pozzetto a partire dal pozzetto positivo (con solo brodo e non antibiotico) e quindi dalla concentrazione più bassa a quella più alta.

*Incubazione.* Le micropiastre sono state incubate a 37°C in camera umida e la lettura è stata effettuata dopo 24 ore.

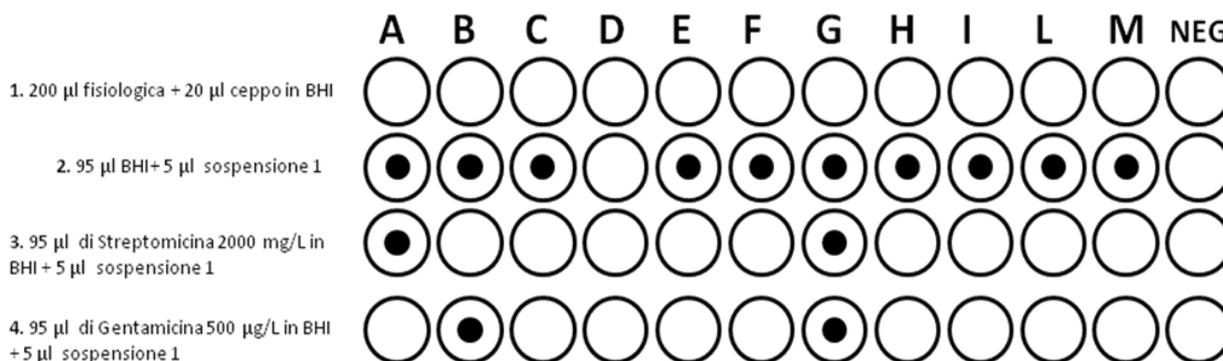
*Interpretazione.* La concentrazione più bassa alla quale non ho crescita batterica, rappresenta la MIC. Il dato può essere interpretato correttamente solo se per lo stesso ceppo si è avuta crescita nel pozzetto positivo e se il pozzetto negativo mostra assenza di crescita batterica.



**Figura 1. Minima concentrazione inibente (MIC).** Rappresentazione schematica dell'esecuzione del test per la determinazione della MIC con metodo per diluizione in terreno liquido in micropiastra. Il campione 1 ha una MIC pari a 4 mg/L; il campione 2 ha una MIC di 2 mg/L; i campioni 3 e 4 hanno una MIC di 1 mg/L. ● = crescita batterica. Per la validità della prova, nei pozzetti negativi (-) non si deve riscontrare crescita batterica, mentre la crescita deve essere sempre evidente nei pozzetti positivi (+), dove non c'è antibiotico.

#### 4. Valutazione della resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi (*High-Level Aminoglycoside Resistance, HLAR*)

Come definito dai protocolli CLSI/NCCLS (Shryock et al., 2002), è stato utilizzato il metodo di screening con brodo diluizione. Dai ceppi batterici in coltura pura è stata preparata una sospensione 0,5 McFarland in BHI. Utilizzando i pozzetti di una micropiastra, su ognuna è stata valutata la resistenza ad alti livelli di gentamicina e streptomina per 88 ceppi (44+44). Come indicato in figura 2, nella prima fila di pozzetti è stata preparata, dai ceppi in BHI, una sospensione 1:10 in soluzione fisiologica. Nella seconda fila, 5 µl di tale sospensione sono stati aggiunti a 95 µl di BHI (controlli positivi); nella terza fila 5 µl di tale sospensione sono stati aggiunti a 95 µl di BHI contenente streptomina a concentrazione di 2000 mg/L, mentre nella quarta fila, 5 µl della sospensione sono stati aggiunti a 95 µl di BHI contenente gentamicina a 500 µg/mL. Le piastre sono state incubate in camera umida a 35°C in aerobiosi. La lettura è stata eseguita dopo 24 ore per la gentamicina e dopo 48 ore per la streptomina.



**Figura 2. Metodo valutazione ceppi HLAR.** Rappresentazione schematica del test per la valutazione dei ceppi HLAR. Il ceppo A è resistente ad alti livelli di streptomicina; il ceppo B è resistente ad alti livelli di gentamicina; il ceppo G è resistente ad alti livelli di gentamicina e streptomicina; la prova del ceppo D è nulla in quanto il ceppo non è cresciuto nel pozzetto con solo BHI. L'ultima colonna (NEG) rappresenta la conferma di sterilità, quindi non si deve avere crescita in alcun pozzetto per la validità dell'intera prova. ● = crescita batterica

### 5. *Classificazione dei ceppi in multi-farmaco resistenti, estesamente resistenti e panresistenti*

In base all'espressione della resistenza a determinate classi di antibiotici (ai quali gli enterococchi sono normalmente sensibili), quali: gentamicina ad alti livelli, streptomicina ad alti livelli; fluorochinoloni (ciprofloxacina, enrofloxacina), glicopeptidi (vancomicina, teicoplanina), glicilcicline (tigeciclina), oxazolidinoni (linezolid), penicilline (ampicilline), streptogramine (quinupristina-dalfopristina) e tetraciclina, i ceppi sono stati classificati in:

- batteri multifarmaco resistenti (MDR o multi drug resistant):* batteri che non sono suscettibili a una o più molecole antibatteriche in almeno 3 classi di farmaci;
- batteri estesamente resistenti (XDR o extensive drug resistant):* batteri che non sono suscettibili a una o più molecole antibatteriche in tutte (ad eccezione di 2) classi di farmaci;
- batteri panresistenti (PDR o pandrug resistant):* batteri che non sono suscettibili a tutte le molecole antibatteriche in tutte le classi di farmaci (Magiorakos *et al.*, 2012).

### 6. *Identificazione di specie tramite caratterizzazione biochimica*

L'identificazione di specie è stata eseguita con l'utilizzo di test biochimici convenzionali (API 20 STREP, Bio Mérieux, Canada) seguendo le indicazioni fornite dal produttore e utilizzando il software Apiweb V 1.1.0 (API20 STREP V 6.0) per l'interpretazione dei risultati ottenuti.

## 4. RISULTATI

### 1. Isolamento dei ceppi batterici

Dai 157 tamponi cloacali effettuati da galline ovaiole, sono stati isolati 137 presunti ceppi di *Enterococcus* spp. Il terreno KAA è piuttosto selettivo; i ceppi dotati di esculinasi, rilasciano esculetina che reagisce con gli ioni  $Fe^{3+}$ , formando un precipitato nero-marrone (Domig et al., 2003). L'esculina però, può essere idrolizzata da tutte quelle specie batteriche dotate di enzima esculinasi ( $\beta$ -D-glucosidasi), e quindi, non solo enterococchi, ma anche ad esempio lattococchi e pediococchi, sono in grado di crescere su tale terreno con colonie di colore nero-marrone.

### 2. Screening di valutazione dell'enzima arginina-decarbossilasi (ADH)

Tutti i 137 ceppi isolati sono stati sottoposti al test dell'ADH come test di screening per escludere dagli isolati eventuali ceppi di *Aerococcus* spp. Infatti, la percentuale di reazione ADH positiva per ceppi di *Aerococcus viridans* e *Aerococcus urinae* è 0-5%, mentre per *Enterococcus* spp., la reazione è positiva al 85-99%. L'unica specie di enterococco con prova ADH negativa è *Enterococcus avium*.

Dei 137 isolati, 115 ceppi (84%) sono risultati ADH positivi e 22 ceppi (16%) sono risultati ADH negativi. I ceppi negativi, anche se sottoposti comunque al test Kirby-Bauer, non sono stati ulteriormente valutati.

### 3. Determinazione della sensibilità in vitro agli antibiotici

#### a. Kirby-Bauer test

Per tutti i 137 ceppi isolati è stato effettuato l'antibiogramma secondo il metodo Kirby-Bauer e i risultati sono riportati nella tabella 3. Tra i 115 ceppi con ADH positivo, è stata riscontrata più frequentemente resistenza (non sensibilità) (vedi tabella 4) per: gli aminoglicosidi in particolare, neomicina (100% dei ceppi non sensibili) e streptomina (93% dei ceppi), per i macrolidi (l'87,8% dei ceppi sono risultati non sensibili all'eritromicina), per i fluorochinoloni (86,1% dei ceppi sono risultati non sensibili all'enrofloxacin) e ai lincosamidi (81,7% dei ceppi sono risultati non sensibili alla clindamicina). Tutti i ceppi sono risultati resistenti alla oxacillina (penicillina semisintetica penicillinasi-resistente) e gran parte alla cefalotina (86,9%) e al trimethoprim (95,7%). Oltre la metà dei ceppi sono risultati non sensibili a ciprofloxacina (70,4%), tetraciclina (65,2%), gentamicina (60%) e quinopristina-

dalfopristina (53,9%). Una moderata resistenza è stata riscontrata per nitrofurantoina (48,7%), linezolid (35,6%), ampicillina (29,6%), tigeciclina (26,1%), rifampicina (22,6%) e cloramfenicolo (19,1%). I ceppi hanno dimostrato invece, una maggiore sensibilità ai glicopeptidi (il 91,3% dei ceppi è risultato essere sensibile alla vancomicina e il 90,4% dei ceppi alla teicoplanina) e all'associazione amoxicillina-acido clavulanico (solo il 13% dei ceppi è risultato non sensibile).

Studiando singolarmente i ceppi, questi hanno mostrato sempre una antibiotico-resistenza multipla per i 21 antibiotici testati. In particolare, non considerando la resistenza a oxacillina e trimethoprim, soltanto un ceppo (n.131) ha mostrato resistenza a 2 antibiotici (neomicina a clindamicina), mentre negli altri casi è stata osservata una resistenza da 3 fino a 18 molecole di antibiotici. 2 ceppi (n. 128, 222) hanno dimostrato di essere sensibili soltanto alla vancomicina, 1 ceppo (188) è risultato essere sensibile solo ad ampicillina e ad amoxicillina-acido clavulanico, 6 ceppi (n. 42, 43, 90, 107, 127, 157) hanno mostrato solo 3 sensibilità e 9 ceppi (n. 41, 45, 64, 92, 93, 98, 133, 179, 189) hanno mostrato sensibilità soltanto per 4 antibiotici.

#### *b. Minima concentrazione inibente (MIC)*

Per i ceppi risultati non sensibili (resistenti o intermedi) alla vancomicina tramite il Kirby-Bauer test, è stata effettuata la determinazione della MIC. 7 ceppi hanno mostrato una MIC pari a 1 mg/L, 1 ceppo una MIC di 2mg/L e 2 ceppi una MIC di 4 mg/L (vedi tabella 6). Per i 34 ceppi risultati non sensibili (resistenti o intermedi) all'ampicillina tramite il Kirby-Bauer test, è stata effettuata la determinazione della MIC che ha permesso di evidenziare: 22 ceppi (64,7%) con MIC  $\leq$  8 mg/L, 7 ceppi (20,6%) con MIC = 16 mg/L, 4 ceppi (11,8%) con MIC =32 mg/L e 1 ceppo (2,9%) con MIC = 64 mg/L (vedi tab. 6).

#### *4. Valutazione della resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi (High-Level Aminoglycoside Resistance, HLAR)*

I 106 ceppi risultati non sensibili a gentamicina e/o streptomicina con Kirby-Bauer test, sono stati valutati per l'espressione di resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi. Nessuno dei ceppi testati a mostrato una resistenza ad alti livelli di gentamicina, mentre 19 ceppi (18%) sono risultati resistenti ad alti livelli di streptomicina (2000  $\mu$ g/ml) (vedi tabella 6).

5. *Classificazione dei ceppi in multi-farmaco resistenti, estesamente resistenti e panresistenti*

In base alla classificazione proposta da Magiorakos *et al.* (2012), sono stati individuati 59 ceppi MDR (51,3%) e 10 ceppi XDR (8,7%). Nessuno dei ceppi esaminati è risultato PDR.

6. *Identificazione di specie tramite caratterizzazione biochimica*

Per i 69 ceppi, classificati come MDR e XDR, è stata effettuata la tipizzazione tramite API Strep 20 che ha permesso di identificare 48 *Enterococcus faecium*, 14 *Enterococcus faecalis*, 6 *Enterococcus durans* e 1 *Enterococcus avium*.



Antibiotico	Ceppi resistenti	Classificazione (Magiorakos et al., 2012)	Identificazione
N; DA	131	/	
N; S; DA	60; 61; 62	/	
N; S; KF	130	/	
N; S; E; DA	53	/	
N; S; E; DA; ENR	106	/	
N; S; KF; ENR	156	/	
N; S; KF; E; DA; TE	50	/	
N; S; CIP; ENR; E; DA	125	/	
N; S; CIP; ENR; E; DA; TE	126	/	
N; S; ENR; E; QD; DA; TE	49	MDR	<i>E. faecium</i>
N; S; KF; E; QD; TE	121	/	
N; S; KF; E; QD; DA; TE	84; 164	MDR (164)	<i>E. avium</i>
N; S; KF; ENR; DA; AMP; TE	113	MDR	<i>E. faecium</i>
N; S; KF; ENR; E; DA; AMP; TE	122	MDR	<i>E. faecium</i>
N; S; KF; CIP; ENR; E; DA	163	/	
N; S; KF; CIP; ENR; E; DA; AMP	123	/	
N; KF; DA	85	/	
N; E; DA; TE	124	/	
N; ENR; E; DA	172	/	
N; C; E; DA; TE	52	/	
N; RD; S; E; DA; TE	59	/	
N; RD; S; KF; ENR; DA; AMC; AMP	71	/	
N; RD; F; S; KF; CIP; ENR; E; AMP	112	/	
N; RD; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	37; 38	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; RD; LZD; F; CN; S; KF; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	39	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; RD; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	46	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; RD; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; VA; E; QD; DA; TE	101	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; VA; E; QD; DA; TE; TGC	43	XDR	<i>E. faecalis</i>
N; RD; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE	58	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; S; CIP; ENR; DA	129	/	
N; F; S; KF; CIP; ENR; E; DA	165	/	
N; F; S; KF; CIP; ENR	67	/	
N; F; S; KF; ENR; E; DA	70	/	
N; F; S; KF; ENR; E; DA; TE	34	/	
N; F; S; KF; CIP; ENR; E	55; 77	/	
N; F; S; KF; CIP; ENR; E; TE	166	/	
N; F; CN; S; KF; ENR; E	68	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; DA; AMC; TE	80	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E	73	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; AMP	74	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; TE	111	/	
N; F; CN; S; KF; ENR; E; DA; AMP; TE	110	MDR	<i>E. faecium</i>
N; CN; S; KF; ENR; QD; DA	66	/	
N; CN; S; KF; ENR; DA; TE	96	/	
N; CN; S; KF; E; QD; DA; TE	97; 99	/	
N; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA	81; 119	MDR (81)	<i>E. durans</i>
N; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE	108; 120	MDR	<i>E. faecium</i>
N; CN; S; CIP; ENR; E; DA	161	/	
N; CN; S; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	229	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; CN; S; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	40	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	31; 109; 168	MDR	<i>E. faecium</i>
N; CN; S; KF; CIP; ENR; QD; DA; AMC; AMP; TGC	65	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; C; F; S; KF; ENR; E; QD; DA; TE	57	MDR	<i>E. faecium</i>
N; C; LZD; S; KF; ENR; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	87	XDR	<i>E. faecium</i>
N; C; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	89	MDR	<i>E. faecium</i>

N; C; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; VA; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	92	XDR	<i>E. faecalis</i>
N; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; DA; AMC	82	MDR	<i>E. faecium</i>
N; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	177	MDR	<i>E. faecium</i>
N; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMC; AMP; TE; TGC	107; 157	MDR	<i>E. faecium</i> (107)   <i>E. durans</i> (157)
N; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; VA; E; QD; DA; TE; TGC	42	XDR	<i>E. durans</i>
N; F; S; KF; CIP; ENR; E; DA	224	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E	221	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD	225	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; TE	220	/	
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; AMC; AMP; TE	76	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; DA; AMC; TE	79	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMC; AMP	86	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; CN; S; CIP; ENR; VA; E; DA; AMP; TE	160	MDR	<i>E. durans</i>
N; F; S; KF; CIP; ENR; E; AMC; AMP	69	/	
N; F; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	54	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; DA; TE	226	MDR	<i>E. faecium</i>
N; F; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; TE	162	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; E	230	/	
N; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; E; DA	190	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; CN; S; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	219	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; LZD; CN; S; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	36	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; LZD; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE	118	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; AMP; TE	104	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; N; CN; S; KF; CIP; ENR; E; TGC	91	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA	75	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; AMC; AMP	78	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	103; 223	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	114	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMC; AMP; TE	167	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; CN; S; KF; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	175	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	158	MDR	<i>E. faecium</i>
N; LZD; F; S; KF; CIP; ENR; VA; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	173	XDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; F; S; KF; CIP; ENR; E; DA; AMP; TE	94	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMC; AMP; TE; TGC	64	MDR	<i>E. durans</i>
N; RD; C; LZD; CN; S; KF; ENR; E; QD; DA; TE; TGC	33	MDR	<i>E. faecalis</i>
N; RD; C; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; VA; E; QD; DA; TE; TGC	41; 45	XDR (41)   MDR (45)	<i>E. faecalis</i>
N; RD; C; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; AMP; TE	98	XDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; AMP; TE; TGC	90	XDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE	93	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMP; TE	133	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; TE	189	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; VA; E; QD; DA; TE; TGC	188	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; C; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; AMC; AMP; TE; TGC	128; 222	XDR	<i>E. durans</i> (128)   <i>E. faecium</i> (222)
N; RD; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; VA; E; QD; DA; TE	105	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; TEC; E; QD; DA; TE; TGC	179	MDR	<i>E. faecium</i>
N; RD; LZD; F; CN; S; KF; CIP; ENR; E; QD; DA; AMC; AMP; TE; TGC	127	MDR	<i>E. faecium</i>

**Tabella 5. Classi di resistenza dei 115 ceppi di *Enterococcus* spp.** (MDR= multidrug-resistant; XDR= extensively drug-resistant)

Ceppo	MIC Ampicillina	MIC Vancomicina	HLAR	
	(mg/L)	(mg/L)	Strepto	Gentam
31	NV	NV	-	-
33	NV	NV	-	-
34	NV	NV	-	NV
36	NV	NV	+	-
37	NV	NV	-	-
38	NV	NV	-	-
39	NV	NV	-	-
40	NV	NV	-	-
41	NV	1	+	-
42	NV	1	+	-
43	NV	1	+	-
45	NV	1	-	-
46	NV	NV	-	-
49	NV	NV	-	NV
50	NV	NV	-	NV
53	NV	NV	-	NV
54	NV	NV	-	NV
55	NV	NV	-	NV
57	NV	NV	-	NV
58	≤ 8	NV	+	NV
59	NV	NV	-	NV
64	16	NV	-	-
65	NV	NV	-	-
66	≤ 8	NV	-	-
67	NV	NV	-	NV
68	NV	NV	-	-
69	≤ 8	NV	-	NV
70	NV	NV	-	NV
71	≤ 8	NV	-	NV
73	NV	NV	-	-
74	≤ 8	NV	-	-
75	NV	NV	-	-
76	≤ 8	NV	-	-
77	NV	NV	-	NV
78	≤ 8	NV	-	-
79	NV	NV	+	-
80	NV	NV	-	-
81	NV	NV	+	-
82	NV	NV	-	-
84	NV	NV	-	-

86	16	NV	-	-
87	64	NV	+	-
89	≤ 8	NV	-	-
90	≤ 8	NV	+	-
91	NV	NV	-	-
92	≤ 8	2	-	-
93	≤ 8	NV	-	-
94	≤ 8	NV	-	-
96	NV	NV	-	-
97	NV	NV	-	-
98	32	NV	+	-
99	NV	NV	-	-
101	NV	4	+	-
103	NV	NV	+	-
104	≤ 8	NV	-	-
105	NV	4	+	-
106	NV	NV	-	-
107	32	NV	-	-
108	16	NV	-	-
109	NV	NV	-	-
110	16	NV	+	-
111	NV	NV	-	-
112	≤ 8	NV	-	NV
113	32	NV	-	NV
114	≤ 8	NV	-	-
118	NV	NV	-	NV
119	NV	NV	-	-
120	16	NV	-	-
121	NV	NV	-	NV
122	16	NV	-	NV
123	16	NV	-	NV
125	NV	NV	-	NV
126	NV	NV	-	NV
127	≤ 8	NV	-	-
128	≤ 8	NV	-	-
129	NV	NV	-	NV
130	NV	NV	-	NV
133	≤ 8	NV	-	-
156	NV	NV	-	NV
157	≤ 8	NV	-	-
158	NV	NV	-	NV
160	≤ 8	≤ 8	-	-

161	NV	NV	-	-
162	NV	NV	-	NV
163	NV	NV	-	NV
164	NV	NV	+	NV
165	NV	NV	-	NV
166	NV	1	-	NV
167	32	NV	-	-
168	NV	NV	-	-
173	≤ 8	1	-	NV
175	NV	NV	-	-
177	NV	NV	-	-
179	NV	NV	-	-
188	NV	1	-	-
189	NV	NV	+	-
190	NV	NV	+	-
219	NV	NV	+	-
220	NV	NV	-	-
221	NV	NV	-	-
222	≤ 8	NV	-	-
223	NV	NV	-	-
224	NV	NV	-	NV
225	NV	NV	-	-
226	NV	NV	-	NV
229	NV	NV	+	-
230	NV	NV	-	-

**Tabella 6. Minima concentrazione inibente per Ampicillina e Vancomicina e resistenza ad alti livelli per Streptomicina e Gentamicina (NV= non valutato; - = sensibile; + = resistente)**

## 5. DISCUSSIONE

In questo studio è stata valutata l'espressione dell'antibiotico-resistenza di 115 ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da tamponi cloacali di galline ovaiole di allevamenti rurali della provincia di Massa Carrara.

I 137 ceppi isolati da terreno KAA sono stati sottoposti ad antibiogramma secondo il metodo Kirby-Bauer e alla prova di screening per l'enzima ADH. Tutti i 115 ceppi di *Enterococcus* spp. caratterizzati da ADH positiva, hanno mostrato resistenze plurime per i 21 antibiotici testati. Come atteso, tutti i ceppi sono risultati resistenti alla oxacillina (penicillina semisintetica penicillinasi-resistente) e gran parte di essi sono risultati sensibili alla cefalotina (86,9%) e al trimethoprim (95,7%). La resistenza per questi antibiotici è infatti, intrinseca per la specie *Enterococcus* spp. (vedi introduzione) e pertanto non sono utilizzati per trattare infezioni enterococciche dell'uomo (Murray, 1998). Per questo, tali antibiotici non sono stati ulteriormente considerati per la valutazione delle classi di resistenza.

I pattern di resistenza osservati, sono risultati disomogenei, avendo riscontrato 101 classi di resistenza diverse per i 115 ceppi esaminati. Questo è analogo a quanto osservato in altri studi condotti su enterococchi isolati da polli (Diarra *et al.*, 2010; Furtula *et al.*, 2013), anche se la comparazione non è facile in quanto nei vari monitoraggi e/o studi vengono utilizzate molecole antibiotiche diverse. In questo studio, comunque, la disomogeneità dei pattern di resistenza può essere anche conseguenza dell'alto numero di molecole utilizzate per l'esecuzione dell'antibiogramma. Ad eccezione di un ceppo che ha mostrato resistenza solo per due antibiotici (neomicina e clindamicina), sono stati osservati pattern di resistenza caratterizzati da 3 a 18 molecole non efficaci. In particolare, sono stati osservati 2 ceppi sensibili soltanto alla vancomicina, 1 ceppo sensibile solo ad ampicillina e ad amoxicillina-acido clavulanico, 6 ceppi risultati sensibili soltanto a 3 molecole e 9 ceppi sensibili soltanto a 4 antibiotici tra quelli testati.

Le maggiori percentuali di resistenza sono state osservate per gli aminoglicosidi, in particolare per neomicina e streptomina. Gli enterococchi, sono però caratterizzati da una resistenza intrinseca per basse/moderate concentrazioni di aminoglicosidi a causa di una scarsa permeabilità cellulare (*E. faecalis*), per la presenza dell'enzima AME (*aminoglycoside-modifying enzyme*) e per la metiltransferasi modificante i ribosomi (*E. faecium*) (Hollenbeck *et al.*, 2012). Nonostante questa resistenza intrinseca, l'influsso nella cellula batterica delle molecole di aminoglicoside, molecole altamente polari, può essere aumentata associando

molecole attive verso la parete cellulare come penicilline e vancomicina (Arias e Murray, 2013). Una volta penetrato nella cellula l'aminoglicoside può però risultare inattivo per la presenza di meccanismi di resistenza acquisiti. I ceppi resistenti hanno MIC superiori o uguali a 2000 µg/ml per streptomina e 500 µg/mL per la gentamicina e sono definiti HLAR. È importante quindi valutare la presenza di resistenza acquisita ad alti livelli di aminoglicosidi in quanto, se presente, i ceppi risultano anche resistenti all'associazione penicilline/aminoglicosidi, che rappresenta una delle principali opzioni terapeutiche nelle infezioni da enterococchi dell'uomo. Il test Kirby-Bauer, però, non permette di distinguere tra resistenza intrinseca e resistenza acquisita e quindi i 106 ceppi risultati non sensibili a streptomina e/o gentamicina (con Kirby-Bauer) sono stati valutati per l'espressione della resistenza ad alti livelli di questi antibiotici. Nessuno dei ceppi testati è risultato resistente ad alti livelli di gentamicina (500 µg/ml), mentre 19 ceppi su 106 (18%) sono risultati resistenti ad alti livelli di streptomina (2000 µg/ml). I ceppi che non presentano resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi, possono essere suscettibili all'effetto sinergico di gentamicina/streptomina con ampicillina se la MIC per ampicillina è  $\leq 32$  µg/ml (Wikler *et al.*, 2006). Quindi per i 34 ceppi di *Enterococcus* spp. risultati non sensibili (resistenti o intermedi al Kirby-Bauer) all'ampicillina, è stata valutata la MIC per questa molecola. Un solo ceppo ha mostrato una MIC<sub>Amp</sub> = 64 µg/ml (n. 87). Un'infezione da tale ceppo non potrebbe, quindi, essere trattata con l'associazione aminoglicoside/ampicillina. Negli altri casi invece l'associazione potrebbe essere utilizzata con gentamicina per la quale non sono state osservate resistenze ad alti livelli o anche con streptomina, per i ceppi in cui non si è avuta espressione di resistenza ad alti livelli per questa molecola.

L'87,8% dei ceppi isolati sono risultati non sensibili all'eritromicina. Questo dato è in accordo con altri monitoraggi condotti negli avicoli, nei quali, la resistenza all'eritromicina è diffusa in enterococchi isolati da tacchini (Jaglic *et al.*, 2012), broiler (Aerstrup *et al.*, 2000; Seputiene *et al.*, 2002; Diarra *et al.*, 2010; Petsaris *et al.*, 2005; Furtula *et al.*, 2013) e galline ovaiole allevate a terra (Obeng *et al.*, 2013). Anche i dati pubblicati dall'EFSA (European Food Safety Authority) sui monitoraggi dell'antibiotico-resistenza confermano che la resistenza ai macrolidi negli enterococchi è più elevata nei ceppi isolati da avicoli (Garcia-Migura *et al.*, 2014). Nei ceppi di enterococchi resistenti all'eritromicina, spesso vengono riscontrati i geni *erm*, in particolare il gene *erm*(B), che conferiscono resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramina B (MLS<sub>B</sub>). Infatti, anche in questo studio, dei 101 ceppi non sensibili all'eritromicina, 45 (39,1% del totale dei ceppi isolati) mostrano contemporanea

resistenza a clindamicina e quinopristina-dalfopristina (in realtà, il numero dei ceppi riscontrati con resistenza combinata a MLS<sub>B</sub> sarebbe più alto, ma non sono stati inclusi i ceppi identificati come *E. faecalis*, in quanto dotati di resistenza intrinseca per lincosamidi e streptogramine). È probabile quindi che questi ceppi siano dotati di meccanismi di resistenza acquisita verso MLS<sub>B</sub>, i principali dei quali sono: metilazione del 23S rRNA tramite gli enzimi codificati dai geni *erm*; efflusso attivo delle molecole codificato dai geni *mef* per i macrolidi (Petsaris *et al.*, 2005), *msr* per macrolidi e streptogramina B e gene *lsa* per lincosamidi e streptogramina B; infine, inattivazione di macrolidi, lincosamidi e streptogramina B codificata rispettivamente dai geni *mph*, *lnu* e *vgb* (Jaglic *et al.*, 2012).

Alti livelli di resistenza sono stati riscontrati anche per i fluorochinoloni: l'86,1% dei ceppi sono risultati non sensibili a enrofloxacin e il 70,4% dei ceppi sono risultati non sensibili a ciprofloxacina. Questo risultato appare diverso da altri studi in cui la resistenza ai fluorochinoloni in enterococchi isolati da polli è stata del 30-40% (Diarra *et al.*, 2010; Šeputienė *et al.*, 2012). Questa alta resistenza deve destare preoccupazione in quanto i fluorochinoloni sono molecole di elezione in terapia umana. Una mancata politica restrittiva sull'utilizzo degli antibiotici ha portato all'utilizzo in larga scala anche in zootecnia di molecole di importanza critica per la salute umana come i fluorochinoloni determinando un aumento delle resistenze dei ceppi batterici: ad esempio in uno studio, il 67% degli enterococchi isolati da bovini con sintomatologia clinica, ha mostrato resistenza per ciprofloxacina (Šeputienė *et al.*, 2012).

La resistenza per tetraciclina è stata riscontrata nel 65,2% dei ceppi. Tale resistenza è simile a quella osservata anche in altri studi (Furtula *et al.*, 2013), anche se per altri autori la percentuale di resistenza osservata era maggiore (91,3%) (Diarra *et al.*, 2010). Generalmente la resistenza alla tetraciclina è causata dai diversi geni; tra questi, i geni più frequentemente riscontrati per ceppi di origine animale sono *tetM* e *tetL*, codificanti per pompe di efflusso attivo dell'antibiotico.

La resistenza osservata per nitrofurantoina è stata del 48,7% dei ceppi, analogamente a studi condotti su broiler, in cui la resistenza per questo antibiotico è stata del 52,9% per *E. faecium* e del 44,4% per *E. hirae* (Diarra *et al.*, 2010). Le resistenze osservate invece per rifampicina e cloramfenicolo sono state rispettivamente di 22,6% e 19,1%. La bassa espressione di resistenza per queste molecole è in accordo con altri studi (Aarestrup *et al.*, 2000), ma queste molecole hanno una scarsa importanza clinica nel trattamento delle infezioni da enterococchi.

Le resistenze osservate per linezolid e tigeciclina sono state rispettivamente del 35,6% e 26,1%. Questi due antibiotici, di più recente introduzione sul mercato sono importanti per il trattamento di infezioni da enterococchi glicopeptide-resistenti, quindi una resistenza acquisita nei confronti di queste molecole, rappresenta un rischio per la salute umana. Si riporta che la resistenza per queste due molecole sia sporadica (Hollenbeck and Rice, 2012), ma in questo studio la resistenza è risultata significativa.

La resistenza per i glicopeptidi è stata di 9,6% per la teicoplanina e di 8,7% per la vancomicina. La resistenza per la vancomicina ha suscitato molte preoccupazioni nell'ambito dei monitoraggi dell'antibiotico-resistenza in quanto legata all'utilizzo di avoparcina (glicopeptide che induce cross-resistenza per vancomicina) come promotore di crescita soprattutto nell'ambito avicolo e suinicolo. Da quando l'utilizzo di avoparcina è stato proibito, la prevalenza di enterococchi vancomicina-resistenti è diminuita, ma ancora persiste negli animali da reddito e la diffusione dei geni di resistenza attraverso i prodotti di origine animale rappresenta un serio pericolo per la salute pubblica (Garcia-Migura, 2014). La vancomicina è infatti considerata un antibiotico cosiddetto di "ultima risorsa" importante in medicina umana per il trattamento di infezioni da *Enterococcus* spp. multi-resistenti e da *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA) (Nilsson, 2012). Per i ceppi risultati non sensibili (resistenti o intermedi) alla vancomicina tramite il Kirby-Bauer test, è stata effettuata la determinazione della MIC che però non ha confermato il dato di resistenza. Infatti, come evidente dalla tabella 6, 7 ceppi hanno mostrato una MIC pari a 1 mg/L, 1 ceppo 2mg/L e 2 ceppi una MIC di 4 mg/L mentre in base ai protocolli CLSI/NCCLS (Shryock *et al.*, 2002) la resistenza acquisita per vancomicina dovrebbe conferire una MIC superiore o uguale a 16 mg/L. Fino ai valori di MIC pari a 8-16 mg/L, infatti, la resistenza è considerata intermedia ed è generalmente intrinseca come nelle specie *E. gallinarum*, *E. flavaescens*, *E. casseliflavus* dotati del gene *vanC*. Pertanto, in questo studio, la resistenza per vancomicina riscontrata con antibiogramma non è risultata significativa.

Per la classificazione dei ceppi è stata utilizzata la proposta di un gruppo di esperti internazionali fatta per iniziativa del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) e del Centres for Disease Control and Prevention (CDC) (Magiorakas *et al.*, 2012). La classificazione prevede la valutazione della resistenza a particolari molecole verso la quali gli enterococchi non mostrano resistenza intrinseca. In particolare, sono stati identificati 59 ceppi MDR (51,3%) e 10 ceppi XDR (8,7%). I ceppi MDR mostravano resistenza per almeno una molecola in 3-6 classi antibiotiche, mentre i ceppi XDR erano caratterizzati da una non-

sensibilità ad almeno una molecola in tutte le classi di antibiotici (ad eccezione al massimo di due). I ceppi quindi, risultavano sensibili solo a una o due classi di antimicrobici. Il 60% (69 ceppi su 115) dei ceppi, ha mostrato quindi, un'espressione fenotipica di elevata e diffusa resistenza acquisita, rappresentando un potenziale pericolo quale serbatoio di geni di resistenza.

I 69 ceppi classificati come XDR e MDR, sono stati sottoposti a identificazione biochimica e sono stati riscontrati: 48 ceppi di *Enterococcus faecium*, 14 ceppi di *Enterococcus faecalis*, 6 ceppi di *Enterococcus durans* e 1 ceppo di *Enterococcus avium*. *E. faecium* è infatti, la specie più comunemente riscontrata nell'intestino degli animali, mentre *E. faecalis* risulta essere la specie comune nell'uomo. *E. durans* è tipicamente isolato da feci di avicoli, trovandosi nel tratto gastrointestinale di queste specie infatti, la sua presenza in campioni di acqua di superficie è indicativa di contaminazione ambientale da parte di allevamenti avicoli (Furtula *et al.*, 2013). Il riscontro di 1 ceppo di *E. avium* è stato inaspettato in quanto questa specie è caratterizzata da test ADH negativo e pertanto doveva essere già stato escluso con la prima prova di screening. La sua identificazione potrebbe essere quindi il risultato di un errore del sistema API Strep 20 o del test di valutazione dell'ADH.

Gli enterococchi, considerati inizialmente come commensali non patogeni del tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali, sono emersi negli ultimi 30 anni come importanti agenti di infezioni nosocomiali (Gilmore *et al.*, 2013). *E. faecium* e *E. faecalis* sono le specie maggiormente coinvolte in infezioni acquisite negli ospedali con ceppi che mostrano resistenza acquisita verso antibiotici cosiddetti "last line" come la vancomicina (Palmer *et al.*, 2010). *E. faecium* è, infatti, compreso tra i patogeni "ESKAPE" insieme a *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., i quali causano il maggior numero di infezioni nosocomiali, ma "sfuggono" (*escape*) agli effetti delle terapie antibiotiche (Hammerum, 2012). I ceppi di *E. faecium* isolati da infezioni nosocomiali sono ceppi appartenenti al complesso clonale 17 (*clonal complex* 17, CC17) caratterizzati da resistenza all'ampicillina, ad alti livelli di ciprofloxacina, e spesso anche alla vancomicina oltre a possedere specifici geni di virulenza (Homan *et al.*, 2002; Hammerum *et al.*, 2010). Questi ceppi hanno sequenze genomiche diverse da quelle di ceppi isolati da animali quindi si tratta, probabilmente, di ceppi adattati all'ambiente nosocomiale umano. In altri studi è stato evidenziato però, che l'ospite specificità dei ceppi CC17 può non essere così ristretta. Il cane ad esempio può essere serbatoio di ceppi appartenenti alla sequenza tipo 78, che fa parte del CC17. Inoltre, ceppi di

*E. faecium* con sequenze tipo 132 (anche queste parte del CC17), sono state isolate dal maiale così come ceppi con sequenza ST17 (una delle sequenze più comuni di CC17) sono stati isolati dal bovino e da carne di pollo (Lopez *et al.*, 2009; Hammerum *et al.*, 2010). Lo studio delle diverse varianti del trasposone *Tn 1546*, trasposone tipico di *E. faecium*, che codifica per 9 polipeptidi tra cui VanR, VanS, VanA, VanH, VanX, VanY, responsabili della resistenza alla vancomicina, ha permesso di evidenziare che le stesse varianti si possono ritrovare sia in enterococchi di origine umana che animale. È stato inoltre dimostrato che ceppi di diversa origine possono trasferirsi il gene *vanA* unitamente a *vatE* e *ermB*, codificanti per la resistenza a MLS<sub>B</sub> nell'intestino dell'uomo, così come ceppi di origine animale possono trasferire il gene *vanA* a ceppi CC17 di origine umana (Hammerum *et al.*, 2010). Infine, plasmidi con alto grado di analogia (plasmidi pVEF1 e pVEF2 contenenti il gene *vanA*) sono stati isolati da polli e da un avicoltore (Sletvold *et al.*, 2007). Tutti questi studi indicano quindi che il trasferimento di geni tra enterococchi di origine animale e umana può avvenire, nonostante possa esserci un certo grado di ospite-specificità tra i vari ceppi di *E. faecium*. Quindi, ceppi di *E. faecium* di origine animale spesso non rappresentano un pericolo diretto di infezione per l'uomo, ma possono agire da donatori di geni di resistenza per altri ceppi di enterococchi patogeni e altre specie batteriche (Hammerum *et al.*, 2010). Diversa è l'epidemiologia di *E. faecalis* per il quale l'ospite-specificità è meno evidente e gli stessi tipi di sequenze sono state riscontrate in ceppi di origine umana e animale. Ad esempio la sequenza ST6 (CC2) è stata riscontrata in pazienti ospedalizzati, in individui sani e in feci di maiale; analogamente la sequenza ST16 è stata dimostrata per ceppi isolati da suini, da pollame così come da persone sane e pazienti con endocardite. Ceppi di *E. faecalis* di origine animale rappresentano quindi un pericolo diretto per l'uomo e in particolare i ceppi appartenenti ai complessi clonali CC2, CC9 e CC87 sono considerati ad alto rischio in quanto rappresentano i maggiori responsabili di infezione nell'uomo (Hammerum *et al.*, 2010).

La presenza di enterococchi multi-resistenti agli antibiotici negli animali da reddito, rappresenta un pericolo non sottovalutabile per la salute pubblica in quanto gli allevatori, gli operatori di stalla e dei macelli così come i veterinari hanno un rischio diretto di essere infettati o colonizzati con batteri resistenti attraverso lo stretto contatto con animali portatori o infetti. Benché questa limitata via di trasmissione non sembra rappresentare un rischio per l'intera popolazione, le categorie di lavoratori interessati e i loro familiari, possono rappresentare una via di accesso per l'entrata di geni della resistenza nella comunità e nell'ambiente ospedaliero dove è possibile che avvenga un'ulteriore diffusione dei geni ai

ceppi patogeni (Marshall *et al.*, 2011). La trasmissione all'uomo di ceppi antibiotico-resistenti può avvenire però, non solo per contatto diretto, ma anche attraverso alimenti di origine animale. Ciò è stato dimostrato per numerose specie batteriche come *Listeria* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (Marshall *et al.*, 2011) così come per gli enterococchi. Numerosi studi hanno evidenziato la presenza di enterococchi antibiotico-resistenti in alimenti di origine animale e in particolare in carne di pollo, tacchino e suino (Diarra *et al.*, 2010; Robredo *et al.*, 2000). Quando un ceppo antibiotico-resistente si isola dall'animale in vita, lo stesso ceppo può ritrovarsi nei prodotti alimentari in vendita al dettaglio da questo originati (Marshall *et al.*, 2011). L'uomo può quindi infettarsi ed essere colonizzato da ceppi di enterococchi antibiotico-resistenti tramite il consumo di alimenti. Gli enterococchi sono in grado di resistere all'acidità gastrica, moltiplicarsi a livello intestinale ed essere quindi eliminati nelle feci fino a 14 giorni dopo ingestione (Sørensen *et al.*, 2001). Comunque, anche se i ceppi derivati da animali colonizzano l'intestino dell'uomo solo per un breve periodo, questo può essere sufficiente affinché i geni di resistenza possano essere trasmessi ad altri ceppi meglio adattati a colonizzare l'intestino umano (Nilsson, 2012).

In questo studio, ceppi di *Enterococcus* spp. sono stati isolati da galline ovaiole di allevamenti rurali a conduzione familiare. Questi possono rappresentare un pericolo per la salute pubblica in quanto gli animali vivono a più stretto contatto con l'uomo, spesso condividendo aree esterne e giardini, rispetto ad animali di allevamenti industriali che vivono confinati in capannoni. Gli animali infetti o colonizzati possono avere contatti diretti con l'allevatore e familiari, compresi bambini e anziani, a loro volta responsabili di trasmissione dei ceppi resistenti in comunità scolastiche o nelle strutture ospedaliere. Gli animali contaminano con le feci ambienti e attrezzature e gli enterococchi eliminati, sono in grado di persistere a lungo negli allevamenti, sia sul suolo che sulle mangiatoie o sui posatoi (Hammerum *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2009). Le attrezzature o gli ambienti contaminati sono spesso condivisi con l'uomo o con altri animali domestici. Ad esempio, la presenza di cani può rappresentare un rischio in quanto è stato dimostrato che questa specie può ospitare ceppi di *E. faecium* appartenenti al complesso clonale CC17 (Hammerum *et al.*, 2010). Il trasferimento di geni di antibiotico-resistenza a questi ceppi, può quindi rappresentare un rischio diretto per l'uomo. Un ulteriore pericolo della contaminazione di spazi aperti è quella del possibile contatto anche con animali selvatici in particolare uccelli quali piccioni e gabbiani che possono avvicinarsi e condividere gli spazi di questi allevamenti e che, a loro volta, possono comportarsi da serbatoi e diffusori di enterococchi antibiotico-resistenti con

contaminazione dell'ambiente anche a distanza (Radhouani *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Radimersky *et al.*, 2010). Negli allevamenti rurali a conduzione ed uso familiare inoltre, le norme igieniche per la raccolta e la manipolazione delle uova così come l'igiene della macellazione sono sicuramente meno scrupolose rispetto agli allevamenti industriali. Analogamente la gestione delle deiezioni e dei reflui è sicuramente meno accurata rispetto agli allevamenti industriali e l'utilizzo come fertilizzante può rappresentare un ulteriore fattore di diffusione dei ceppi resistenti (Furtula *et al.*, 2013). Nel contesto di questi allevamenti la presenza di enterococchi antibiotico-resistenti può rappresentare un rischio per la salute dell'uomo. A questo riguardo, è da sottolineare l'importanza dell'adozione di adeguate misure igieniche al momento della macellazione per evitare la contaminazione fecale così come il lavaggio accurato delle mani, degli utensili e delle attrezzature dopo manipolazione degli alimenti di origine animale. Un'accurata pulizia e disinfezione dei luoghi di ricovero degli animali con vapore e formaldeide, rappresenta il metodo più efficace per ridurre la carica ambientale di enterococchi (Diarra *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2013).

La resistenza antimicrobica è una delle maggiori preoccupazioni a livello mondiale per la salute umana che ha portato allo sviluppo di programmi internazionali di monitoraggio quali: *National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems* (NARMS) negli Stati Uniti ed *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) in Europa (Furtula *et al.*, 2013; Garcia-Migura *et al.*, 2014). Dal loro primo utilizzo negli anni '30 gli antibiotici hanno permesso di salvare milioni di vite umane e il loro utilizzo ha contribuito significativamente a migliorare la salute umana e animale. L'utilizzo degli antibiotici in animali da reddito ha permesso di ottenere animali più sani e produttivi, con una minore incidenza di malattie a ridotta morbilità e mortalità, e di conseguenza avere a disposizione abbondanti quantità di alimenti nutrienti, di alta qualità, e a basso costo per l'alimentazione umana. L'utilizzo degli antibiotici negli animali da reddito però, è anche fonte di una pericolosa pressione selettiva nei confronti dei microrganismi che può portare all'emergenza e al mantenimento di ceppi resistenti così come al trasferimento orizzontale di geni di resistenza (O'Brien, 2002). In particolare, batteri commensali della flora intestinale possono comportarsi da riserve di geni responsabili di antibiotico-resistenza giocando un ruolo chiave nella disseminazione di questi geni verso altri batteri commensali o batteri patogeni (O'Brien, 2002; Oliver *et al.*, 2011). In questo contesto, gli enterococchi quali batteri ubiquitari della flora intestinale degli animali e dell'uomo hanno un ruolo molto importante nella diffusione di antibiotico-resistenza, tale che stanno riscuotendo particolari attenzioni da numerosi gruppi di ricerca nel mondo.

Analogamente ai numerosi dati in letteratura, anche in questo studio, seppur limitato a un numero esiguo di animali di una ristretta area territoriale, gli enterococchi hanno dimostrato carattere di multi-resistenza agli antimicrobici. Gli animali non erano stati sottoposti a trattamenti farmacologici, ma l'espressione di antibiotico-resistenza può presentarsi anche non in concomitanza con trattamenti e può essere presente anche dopo molto tempo dall'interruzione di trattamenti o dalla somministrazione di promotori di crescita (Nilsson *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2013).

La lotta all'antibiotico-resistenza comunque non può prescindere da una azione integrata tra medici e medici veterinari in quanto un utilizzo razionale degli antibiotici deve prevedere una diagnosi corretta, un isolamento e relativo antibiogramma a cui deve seguire una terapia mirata, efficiente e corretta. Sono quindi da evitare i trattamenti antibiotici a scopo profilattico e metafilattico diffusi a tutti gli animali negli allevamenti, così come trattamenti antibiotici non mirati e non adeguatamente prescritti in medicina umana, compresi gli ambiti pediatrici e dentistici. L'uso razionale dei farmaci veterinari, ed in particolare degli antimicrobici, riguarda tutti i soggetti che intervengono in modalità differenti, nel ciclo di somministrazione. È responsabilità dei medici veterinari conoscere bene le molecole per prescrivere i medicinali più appropriati e controllare il loro uso in sicurezza ed è compito dell'allevatore prevenire la malattia e garantire un uso corretto dei medicinali prescritti. La somministrazione dei composti antibatterici deve essere complementare ad una buona pratica di gestione dell'azienda zootecnica e a programmi di vaccinazione correttamente studiati. Infatti, molte condizioni favorevoli all'instaurarsi di malattia potrebbero essere evitate o minimizzate usando pratiche di gestione che riducono significativamente l'esposizione ai batteri causa d'infezione, adottando buone pratiche igieniche e di allevamento. La lotta all'antibiotico-resistenza non può prescindere infine, da un attento monitoraggio dei reali consumi che fornisce un'appropriata conoscenza di quale sia l'attuale utilizzo degli antibiotici.

## 6. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso l'identificazione di enterococchi antibiotico-resistenti in galline ovaiole di allevamenti rurali. Questi ceppi pur mostrando un'alta variabilità nei pattern di resistenza, sono risultati multi-farmaco resistenti ed estensivamente resistenti rappresentando un potenziale rischio per la salute dell'uomo quali agenti di infezione diretta o serbatoi di geni di resistenza. Il rischio per l'uomo è rappresentato dal contatto diretto con gli animali, dalla contaminazione ambientale da parte dei soggetti portatori così come dal consumo di alimenti di origine animale. La lotta all'antibiotico-resistenza non può prescindere da un attento monitoraggio della diffusione e insorgenza di ceppi resistenti e tramite questo studio, è possibile affermare che anche allevamenti rurali di piccole dimensioni possono rappresentare un pericolo per la diffusione e il mantenimento di enterococchi antibiotico-resistenti. Considerando le caratteristiche di resistenza nell'ambiente da parte di *E. faecium* e *E. faecalis*, è essenziale attuare procedure igieniche appropriate durante la macellazione e la manipolazione di animali e carcasse per minimizzare la contaminazione fecale della carne e/o degli alimenti di origine animale, così come eseguire accurate disinfezioni degli ambienti di ricovero. Un' adeguata igiene e pulizia delle mani negli ambienti ospedalieri, è fondamentale per limitare la diffusione di enterococchi in questi ambienti.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37, 127-137.
2. Arias CA, Murray BE (2013) The rise of the *Enterococcus*: beyond the vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10, 266-278.
3. Bauer A, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. *Am J Clin Pathol* 45, 493-496.
4. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012) Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 685-706.
5. Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E (2010) Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 76, 8033-8043.
6. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W (2003) Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp.1. Media for isolation and enumeration. *Intern J Food Microbiol* 88, 147-164.
7. Furtula V, Jackson CR, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers PA (2013) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area on intensive poultry production. *Int J Environ Res Public Health* 10, 1020-1036.
8. Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM (2014) Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 170 (1-2), 1-9.
9. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W (2013) genomic transition of enterococci from gut commensal to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol* 16, 10-16.
10. Gyles C, Boerlin P (2014) Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol* 51, 328-340.

11. Hammerum AM (2012) Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect* 18, 619-625.
12. Hammerum AM., Lester CH, Heuer OE (2010) Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis* 10, 1137-1146.
13. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG (2006) Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol* 17, 111-124.
14. Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A (2010) Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 16, 541-554.
15. Hollenbeck BL, Rice LB (2012) Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 3:5, 421-433.
16. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, van Embden JD, Willems RJ (2002) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 40, 1963-1971.
17. Jaglic Z, Vlkova H, Bardon J, Michu E, Cervinkova D, Babak V (2012) Distribution and characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. *Zoonoses Public Health* 59, 202-211.
18. Lopez M, Saenz Y, Rojo-Bezares B, Martinez S, del Campo R, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C (2009) Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol* 133, 172-178.
19. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an International expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
20. Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24, 718-733.

21. Murray BE (1998) Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 4, 37-47.
22. Nilsson O (2012) Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infect Ecol Epidemiol* 2, 16959.
23. Nilsson O, Greko C, Bengtsson B (2009) Environmental contamination by vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish broiler production. *Acta Vet Scand* 51, 49.
24. Nilsson O, Vågsholm I, Bengtsson B (2013) Proof of concept for eradication of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from broiler farms. *Acta Vet Scand* 55, 46.
25. Norrby R, Powell M, Aronsson B, Monnet DL, Lutsar I, Bocsan IS, Cars O, Giamarelou H, Gyssens IC (2009) ECDC/EMA Joint technical report. The bacterial challenge: time to react.  
([http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf))
26. Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M (2013) Comparison of antimicrobial resistance patterns in enterococci from intensive and free range chickens in Australia. *Avian Pathol* 42, 45-54.
27. O'Brien TF (2002) Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* 34, S78-S84.
28. Oliver SP, Murinda SE, Jayarao BM (2011) Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis* 3, 337-355.
29. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS (2010) Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 13, 632-639.
30. Petsaris O, Miszczak F, Gicquel-Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Humbert F, Sanders P, Leclercq R (2005) Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl Environ Microbiol* 71, 2796-2799.
31. Radhouani H, Igrejas G, Pinto L, Gonçalves, Coelho C, Rodrigues J, Poeta P (2011) Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls

- (*Larus cachinans*) representing an environmental health problem. J Environ Monit 13, 2227-2233.
32. Radimersky T, Frolkova P, Janoszowska D, Dolejska M, Svec P, Roubalova E, Cikova P, Cizek A, Literak I (2010) Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. J Appl Microbiol 109, 1687-1695.
33. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ (2008) Farmacologia. 6a ed. Elsevier; pp 653-666.
34. Robbins KM, Suyemoto MM, Lyman RL, Martin MP, Barnes HJ, Borst LB (2012) An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by *Enterococcus cecorum*. Avian Dis 56, 768-773.
35. Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C (2000) Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. Int J Food Microbiol 54, 197-204.
36. Ruiz-Rodríguez M, Martínez-Bueno M, Martín-Vivaldi M, Valdivia E, Soler JJ (2013) Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. FEMS Microbiol Ecol 85, 495-502.
37. Šeputienė V, Bogdaitė A, Ružauskas, Sužiedėlienė E (2012) Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. Pol J Vet Sci 15, 431-438.
38. Shryock TR, Apley M, Jones RN, Lein DH, Thornsberry C, Walker RD, Watts JL, White DG, Wu CC (2002) CLSI Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards- Second Edition. 22, M31-A2
39. Silva VL, Cacador NC, Cdos S, Fontes CO, Garcia GD, Nicoli JR, Diniz CG (2012) Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. Microbes Environ 27, 179-185.
40. Singh KV, Lewis RJ, Murray BE (2009) Importance of the *epa* locus of *Enterococcus faecalis* OG1RF in a mouse model of ascending urinary tract infection. J Infect Dis 200, 417-420.

41. Sletvold H, Johnsen PJ, Simonsen GS, Anasnaes, Sundsfjord A, Nielsen KM (2007) Comparative DNA analysis of two *vanA* plasmids from *Enterococcus faecium* strains isolated from poultry and a poultry farmer in Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 736-739.
42. Sørensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Møller N, Poulsen RL, Espersen F (2001) Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med* 345, 1161-1166.
43. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hacht DW, Ferraro MJ, Swenson JM, Low DE, Sheehan DJ, Tenover FC, Turnidge JD, Weinstein MP, Zimmer BL (2006) CLSI Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards- Ninth Edition. 26, M2-A9.

## RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare le mie relatrici, dott.ssa *Valentina Virginia Ebani* per il suo fondamentale contributo scientifico e i suoi preziosi suggerimenti necessari per lo svolgimento dello studio e la stesura della tesi e dott.ssa *Annalisa Moni* per la sua fondamentale collaborazione nel reperimento/raccolta dei campioni e altrettanto preziosa collaborazione nell'esecuzione dello studio e soprattutto per i suoi preziosi insegnamenti "sul campo" durante tutto il periodo di tirocinio svolto presso la AUSL 1 Massa Carrara. Ringrazio il dott. *Armando Tognoni*, direttore Dipartimento Prevenzione, U.O.C. Sanità Animale, AUSL 1 Massa Carrara, per la sua grande disponibilità offertami durante tutto il periodo di tirocinio svolto presso la struttura, per i suoi preziosi insegnamenti e per aver permesso lo svolgimento di questo studio. Vorrei inoltre ringraziare il dott. *Fabrizio Bertelloni* per l'indispensabile aiuto in laboratorio nell'esecuzione di tutte le fasi dello studio e per i preziosi insegnamenti e la pazienza dimostrata durante tutto il periodo di tirocinio svolto presso il Laboratorio di Batteriologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie. Particolari ringraziamenti vanno infine, anche a tutti gli operatori tecnici della AUSL di Massa Carrara, e in particolare al Sig. *Andrea Angelotti*, indispensabili per la cattura e il contenimento degli animali.