



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

ENTEROCOCCHI VANCOMICINO-RESISTENTI ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

VANCOMYCIN-RESISTANCE PHENOTYPES, VANCOMYCIN-RESISTANCE GENES, AND RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM FOOD OF ANIMAL ORIGIN

Tesi di Laurea di:
Silvia Sarli

Docente Referente
Chiar.mo Prof.ssa
Vignaroli Carla

Sessione straordinaria: Febbraio 2020
Anno Accademico: 2018/19

RIASSUNTO:

Nel presente studio, vari alimenti di origine animale (carne e uova) sono stati analizzati per valutare la presenza di enterococchi vancomicina-resistenti e studiare il fenotipo e genotipo dei ceppi vancomicina-resistenti.

Più del 60% degli enterococchi isolati apparteneva alla specie *Enterococcus faecium* e il rimanente 40% alla specie *Enterococcus faecalis*.

È stata osservata un'alta % di ceppi resistenti ad ampicillina (66%), ciprofloxacina (52,5%), eritromicina (51,8%), penicillina (41,8%) e tetraciclina (36,9%) e il 53,2% degli isolati era multiresistente mentre solo il 15,6% era sensibile a tutti gli antibiotici.

Per quanto riguarda la resistenza alla vancomicina, è stata riscontrata nel 34,1% degli isolati di *E. faecium* e nel 1,9% degli isolati di *E. faecalis*.

Tutti gli isolati sono stati testati sia per i geni *vanA* e *vanB* (mediante Real Time PCR e multiplex PCR), sia per i geni *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG* (mediante multiplex PCR).

Per gli isolati di *E. faecalis* non sono stati identificati geni di resistenza.

Per gli isolati di *E. faecium*, quando testati con multiplex PCR, 28 portavano il gene *vanA*, mentre quando venivano testati con la Real Time PCR erano 29.

Non è stato identificato nessun isolato positivo per i geni *vanC*, *vanD*, *vanE* o *vanG*.

La ricerca dei geni di resistenza mediante Real Time PCR ha mostrato che tra gli isolati vancomicina-resistenti di *E. faecium* 22 portavano solo il gene *vanA*, 2 solo il gene *vanB2,3* e 7 entrambi i geni *vanA* e *vanB2,3*.

Gli Enterococchi sono considerati un importante patogeno zoonotico e un possibile serbatoio di geni di antibiotico-resistenza potenzialmente trasferibile ad altre specie di batteri; inoltre il consumo di alimenti che contengono ceppi resistenti di enterococchi è considerato una possibile via di trasferimento, sia di batteri che di geni di resistenza, dall'animale all'uomo.

CAMPIONI ESAMINATI:

500 campioni di carne cruda di:

1. Bovino (100)
2. Maiale (100)
3. Pollo (300)

100 campioni di Uova

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE ENTEROCOCCHI

Per i campioni di carne:

1. Pesare 25 g di ciascuna carne
2. Introdurli in una busta per stomacher + 225 mL di diluente (NaCl 8,5%, peptone 1g/ml)
3. Omogenizzare per 2 min
4. Seminare su terreno selettivo (Slanetz Bartley, SB) e su SB + vancomicina (6 mg/L)

Per i campioni di uova:

1. Sterilizzare la superficie esterna delle uova (flambare 5-10 s dopo immersione in etanolo 70%) e svuotarne il contenuto in una busta per stomacher
2. Diluire il contenuto di 5 uova con un volume appropriato di diluente e miscelarlo per 30 s
3. Inoculare l'omogenato su piastra di SB e di SB+ vancomicina (6 mg/L)
4. Incubare piastre a 37 °C per 24-48 h

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE :

- Test biochimici (gallerie API)
- Amplificazione mediante PCR del gene *ddl* specie-specifico

Metodi utilizzati:

Identificazione della sensibilità antimicrobica:

- Metodo della diffusione in agar da dischetto (antibiogramma)
- Determinazione della Minima Concentrazione inibente (MIC) mediante E-test

- Estrazione DNA

- MULTIPLEX PCR
- REAL TIME PCR

Risultati di identificazione della specie enterococcica mediante PCR del gene ddl specie-specifico:

E. faecium

E. faecalis

	N	n	%	n	%
Bovine meat	100	10	10.0	10	10.0
Porcine meat	100	26	26.0	6	6.0
Poultry meat	300	37	12.3	28	9.3
Eggs	100	15	15.0	9	9.0
Total	600	88	14.7	53	8.8

N=numero di campioni
n=numero di ceppi isolati

Risultati del test per la sensibilità: Resistenza agli antibiotici:

Enterococcus faecalis

origin	Bovine (n=10)	Egg (n=9)	Porcine (n=6)	Poultry (n=28)	Total (n=53)
AMP	6(60%)	6 (66,7%)	3 (50%)	18(64,3%)	33(62,3%)
C	0	3 (33,3%)	0	9(32,1%)	12(22,6%)
CIP	1 (10%)	2 (22,2%)	3(50%)	17(60,7%)	22(41,5%)
E	0	2 (22,2%)	3 (50%)	17(60,7%)	22(41,5%)
LZD	0	0	0	0	0
P	0	5(55,6%)	0	3(10,7%)	8 (15,1%)
QD	0	1 (11,1%)	0	0	1 (1,9)
TE	2 (20%)	6(66,7%)	1 (16,7%)	20(71,4%)	29(54,7%)
TEC	0	0	0	0	0
VA	0	0	0	1(3,6%)	1(1,9%)

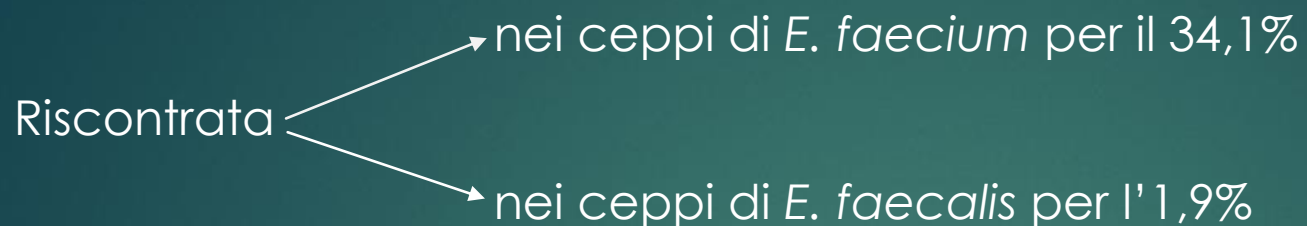
Risultati del test per la sensibilità:

Resistenza agli antibiotici:

Enterococcus faecium

origin	Bovine (n=10)	Egg (n=15)	Porcine (n=26)	Poultry (n=37)	Total (n=88)
AMP	10 (100%)	12(80%)	15(57,7%)	23(62,2%)	60(68,2%)
C	2(20%)	2(13,3%)	4(15,4%)	6(16,2%)	14(15,9%)
CIP	10(100%)	7(46,7%)	16(61,5%)	23(62,2%)	56(63,6%)
E	8(80%)	6(40%)	19(73,1%)	18(48,6%)	51(58%)
LZD	0	2(13,3%)	0	1(2,7%)	3(3,4%)
P	8(80%)	8(53,3%)	16(61,5%)	19(51,4%)	51(58%)
QD	0	2(13,3%)	1(3,8%)	0	3(3,4%)
TE	0	4(26,7%)	4(15,4%)	15(40,5%)	23(26,1%)
TEC	6(60%)	4(26,7%)	11(42,3%)	7(18,9%)	28(31,8%)
VA	8(80%)	4(26,7%)	11(42,3%)	7(18,9%)	30(34,1%)

Resistenza alla vancomicina



Nelle seguente tabella sono stati riportati i diversi livelli di resistenza delle due specie di enterococchi.

	Multiresistenti	Resistenti a più di 2 classi di antibiotici	Sensibili a tutti gli antibiotici
Ceppi <i>E. faecalis</i> (n=53)	26	20	7
Ceppi <i>E. faecium</i> (n=88)	49	24	15

Rilevazione molecolare di geni vancomicina-resistenti in *E. faecium* mediante :

real-time PCR:

	n. ceppi
Gene vanA	22
Gene vanB2,3	2
Gene vanA e vanB2,3	7

multiplex PCR:

	n. ceppi
Gene vanA	28
Gene vanB	2
Gene vanA e vanB	6

VanA e vanB sono considerati i fenotipi più frequenti: in >95% dei ceppi VRE.

- Ceppi VRE portatori del gene vanA:

n=29

%= 93,5

- Ceppi VRE portatori del gene vanB2,3:

n=9

%=29

- In questo studio la resistenza alla vancomicina è stata esibita soprattutto dall' *E. faecium*.
- Sia il test fenotipico che molecolare ha mostrato che quasi tutti i portatori di vanA esprimono la resistenza (p<0,05)
- L'E-test ha dimostrato che , fatta eccezione per 2 ceppi, i restanti 27 ceppi di vanA presentano un elevata MIC alla vancomicina e teicoplanina

Pericolosità riconducibili alla presenza di ceppi di enterococchi resistenti negli alimenti :

1. I risultati indicano una varietà di determinanti di resistenza agli antibiotici potenzialmente trasferibili, in particolare *vanA*, *vanB2* e *vanB3*
2. La combinazione della resistenza agli antibiotici e i determinanti di virulenza possono costituire un rischio per la salute per la disseminazione di VRE.
3. Vigilanza della loro comparsa nel cibo per salvaguardare la salute pubblica.

INOLTRE:

- *VanA* è diffuso in modo simile negli enterococchi delle uova e nei campioni di carne di bovino, suino e pollo.
- La presenza di *vanA* corrisponde al comportamento di resistenza