

## CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI DI *ENTEROCOCCUS*

## ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF *ENTEROCOCCUS*

Bianca Maria Figarolli, Maria Cristina Ossiprandi

### PAROLE CHIAVE:

antibiotico-resistenza, *Enterococcus* spp., vancomicina, fattori di patogenicità.

### KEY WORDS:

antibiotic-resistance, *Enterococcus* spp., vancomycin, pathogenicity factors.

### Riassunto

L'antibiotico-resistenza, 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, è considerata, ad oggi, un problema di estrema importanza nell'ambito della sanità pubblica, in quanto strettamente correlata all'inappropriato utilizzo degli antimicrobici sia in medicina umana che veterinaria (1, 2).

Le modalità con cui i microrganismi evolvono e modificano il loro genoma sviluppando antibiotico-resistenza sono varie e complesse. Alcune specie batteriche vanno incontro a mutazioni spontanee del loro corredo genetico, altre ereditano i geni codificanti per la resistenza per mezzo di plasmidi.

Questo è il caso dei batteri appartenenti al genere *Enterococcus*, microrganismi commensali associati al tratto gastroenterico di uomo e animali, dotati di specifici geni che codificano per la resistenza a svariate categorie di antibiotici quali i glicopeptidi, con particolare riferimento alla vancomicina, gli aminoglicosidi, i  $\beta$ -lattamici. Essendo capaci di trasferire questi geni ad altre specie batteriche, favorendo conseguentemente la diffusione del fenomeno, gli enterococchi sono stati inquadrati come patogeni emergenti responsabili, nell'uomo, di gravi infezioni soprattutto in ambito ospedaliero (3, 4).

Tra le diverse specie animali, quelle d'affezione come il cane, potrebbero svolgere un ruolo rilevante come possibili serbatoi di ceppi di *Enterococcus* antibiotico-resistenti e come eventuali vettori zoonosici.

Nell'eventualità che ciò si verifichi, risulterà necessario mettere in atto opportuni piani di monitoraggio che controllino la presenza degli enterococchi antibiotico-resistenti e la diffusione dei loro determinanti di resistenza tra animali e uomo (1, 5, 6, 7, 8).

---

Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria Dipartimento Salute Animale  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma  
Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032718  
maria.cristina.ossiprandi@unipr.it

## Abstract

“Tolerance” or “antibiotic-resistance” can be defined as the ability of bacteria to grow in presence of high concentrations of antimicrobics or to withstand an antibiotic to which they were once sensitive.

This phenomenon is due to the increased use of antibiotics and helps the rapid diffusion of antimicrobial-resistant bacteria, as it happens for *Enterococcus* genus, and it consists in a progressive adaptation of bacteria as consequence of improper use of antibiotics. Furthermore this process happens faster when antibiotics are used frequently, especially at low doses over long periods of time, event which occurs when antibiotics are added to feed as growth-promoters. Antibiotic resistance develops through mutation or plasmid exchange between bacteria of the same species.

This represents an important problem in public health and in veterinary medicine. Enterococci are commensal bacteria of the intestinal microbiota both in humans or animals, but in recent years they have also emerged as important cause of nosocomial and community-acquired infections. In fact, multidrug-resistant enterococci are important pathogens responsible for nosocomial infections in humans, because they are considered *reservoirs* of genes coding for antimicrobial resistance, which can be spread to other bacterial species.

Animals, such as dogs, carrying antibiotic-resistant enterococci could also be the source of *Enterococcus* infections for humans. As a consequence, failure of antibiotic treatment may occur in human medicine.

So, it is fundamental that such effect is controlled: this problem suggests the importance of monitoring the presence of antibiotic-resistant enterococci and the circulation of their resistance determinants.

## Introduzione

Gli enterococchi sono stati isolati per la prima volta da Thiercelin nel 1899 a partire da campioni fecali di origine umana e sono stati definiti, per lungo tempo, come “streptococchi fecali”. Spetta a Sherman (1937) l’osservazione della loro spiccata diversità rispetto agli altri streptococchi e la conseguente suddivisione del genere *Streptococcus* in quattro gruppi: piogeni, viridanti, lattici ed enterococchi (9). La classificazione e l’identificazione sierologica venne invece proposta da Rebecca Lancefield nel 1933 che inquadrò gli enterococchi come “streptococchi del gruppo D” (9).

Negli anni ’80, il genere *Enterococcus* è stato definitivamente distinto dal genere *Streptococcus* sulla base di tecniche molecolari quali sequenziamento della subunità 16S dell’RNA ribosomiale e ibridizzazione DNA:DNA. Questo nuovo approccio tassonomico ha dimostrato come il genere *Enterococcus* risulti fortemente correlato ai generi *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (9, 10, 11) rispetto a quanto si verificò per i generi *Streptococcus* e *Lactococcus*. Queste stesse procedure hanno consentito di stilare una prima classificazione tassonomica del genere *Enterococcus* con la sua suddivisione in quattro gruppi (9):

- gruppo 1: *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*
- gruppo 2: *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*
- gruppo 3: *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*
- gruppo 4: *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*

Negli anni successivi sono state identificate e classificate nuove specie, come *Enterococcus sulfureus*, isolato da piante e terreno e caratterizzato da una tipica pigmentazione giallastra ed *Enterococcus dispar*, descritto per la prima volta da Collins e collaboratori nel 1991 ed isolato a partire da materiale clinico umano (9, 12).

Il ricorso a test fenotipici, tra cui fermentazione degli zuccheri, mobilità e produzione di pigmento giallo, ha favorito l'identificazione di altre nuove specie (*E. gilvus*, *E. pallens*, *E. ratti*, *E. porcinus*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*) e la creazione di una nuova suddivisione del genere in cinque gruppi (11, 13).

L'inquadramento tassonomico del genere *Enterococcus* è tuttavia in continua evoluzione tanto che il ricorso ai tradizionali metodi di identificazione biochimica risulta spesso insufficiente (*E. faecalis* è considerata l'unica specie che può essere identificata con questi test). Si rende così necessario associarli a tecniche biomolecolari, come quelle citate in precedenza, o ad altre ancora quali elettroforesi sul gel di poliaccrilamide delle proteine di membrana (*SDS-PAGE of whole-cell proteins*), analisi dei polimorfismi di lunghezza delle molecole di tRNA (*tDNA-PCR: tRNA intergenic length polymorphism analysis*), analisi delle sequenze basiche del DNA (*DNA base composition*) (14, 15). Ciò ha permesso di riconsiderare la tassonomia di alcune specie di *Enterococcus* come nel caso di *Enterococcus porcinus* per il quale è stata dimostrata una stretta somiglianza genotipica e fenotipica con un'altra specie di recente identificazione, ovvero *Enterococcus villorum* (14).

Tra le più recenti nuove denominazioni rientra *Enterococcus canis* sp. nov. isolato a partire da cani affetti da otite cronica esterna per i quali ne è stata riscontrata la presenza contestualmente anche a partire da tamponi rettali. Questo ceppo è stato isolato esclusivamente nella specie canina e si differenzia dalle altre specie per il fatto di essere caratterizzato da una reazione negativa al test di Voges-Proskauer, oltre che per l'incapacità di crescere sui comuni terreni selettivi di isolamento impiegati per il genere *Enterococcus*. Inoltre la tecnica di ibridizzazione DNA-DNA ha evidenziato ulteriori differenze genotipiche consentendo di classificarlo, inopinatamente, come nuova specie (14, 15).

Sempre analizzando campioni fecali di cane, è stato isolato un gruppo di enterococchi filogeneticamente correlato ad *E. dispar* ma caratterizzato da specifiche differenze riportabili soprattutto al profilo biochimico, fatto questo che ha indotto i ricercatori ad inquadrarli come "*E. dispar-like*" (15, 16). Ulteriori e più approfonditi studi su *E. dispar* hanno consentito di caratterizzare genotipicamente questa specie, confrontandola con le altre ancora in fase di definitivo inquadramento tassonomico (specie sempre di provenienza fecale a carico del cane), e ne è emersa una forte omologia genomica fra *Enterococcus dispar*, *canis*, ed *asini*. Allo stato attuale vengono riconosciute 38 distinte specie riportate nella tabella che segue (16).

<i>aquimarinus</i>	<i>asini</i>	<i>avium</i>	<i>caccae</i>	<i>canintestini</i>
<i>canis</i>	<i>casseliflavus</i>	<i>cecorum</i>	<i>columbae</i>	<i>devriesei</i>
<i>dispar</i>	<i>durans</i>	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>flavescens</i>
<i>gallinarum</i>	<i>gilvus</i>	<i>haemoperoxidus</i>	<i>hermanniensis</i>	<i>hirae</i>
<i>italicus</i>	<i>malodoratus</i>	<i>moraviensis</i>	<i>mundtii</i>	<i>pallens</i>
<i>phoeniculicola</i>	<i>porcinus</i>	<i>pseudoavium</i>	<i>raffinosis</i>	<i>ratti</i>
<i>saccharolyticus</i>	<i>saccharominimus</i>	<i>seriolicida</i>	<i>silesiacus</i>	<i>solitarius</i>
<i>sulfureus</i>	<i>termitis</i>	<i>villorum</i>		

**Tabella 1:** Specie di *Enterococcus*

Nel cane prevalgono le specie *faecalis* e *faecium* con una frequenza di isolamento riportabile, rispettivamente a valori medi di 40 e 20%.

Facendo invece riferimento alle classiche infezioni nosocomiali da enterococco riscontrate nell'uomo, il quadro epidemiologico generale vede prevalere *Enterococcus faecalis* con una frequenza pari al 90% dei campioni clinici analizzati (sangue, urina, feci ed essudati), seguito da *Enterococcus faecium* identificato con prevalenza del 5-15% nei vari campioni testati. Le altre specie vengono di norma isolate con una frequenza inferiore al 5% (3, 11).

### Inquadramento tassonomico

Gli enterococchi sono batteri gram-positivi di forma coccica, del diametro di circa 1  $\mu\text{m}$  disposti singolarmente oppure a coppie o formanti catene di lunghezza variabile, catalasi negativi, anaerobi facoltativi e immobili, ad eccezione di *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. sulfureus*. Alcune specie si presentano dotate di capsula, mentre altre risultano elaborare un particolare e caratteristico pigmento giallo (*E. casseliflavus*, *E. flavescens*). Risultano sia  $\alpha$ - che  $\beta$ -emolitici se coltivati in agar sangue (terreni addizionati di sangue proveniente da pecora o bovino) con l'eccezione di *E. faecalis* che risulta talvolta privo di attività emolitica (10, 11, 17).

Sono in grado di idrolizzare l'esculina ad una temperatura di 44°C, di resistere a 60°C per 30 minuti, di crescere a temperature variabili tra 10°C e 45°C (*optimum* a T=35°C), di sviluppare a valori di pH pari a 9.6, in presenza di NaCl al 6.5%, di sali biliari al 40% come pure di blu di metilene allo 0.1%. Presentano attività fermentante nei confronti di diversi zuccheri e mostrano una spiccata attività PYRasica (11, 17, 18).

Vengono considerati microrganismi ubiquitari, essendo presenti nell'ambiente (terreno, acqua, vegetali), negli alimenti di origine animale e soprattutto nel tratto gastroenterico di animali e uomo. Nell'uomo sono stati isolati occasionalmente anche dal tratto genito-urinario come pure dalla cavità buccale (9, 10, 11).

L'isolamento degli enterococchi si effettua sia a partire da campioni di acqua, grazie al metodo della filtrazione su membrana, sia da campioni clinici (feci, urine, sangue, essudati ecc.) mediante isolamento su specifici terreni selettivi di isola-

mento (10, 11, 18). La successiva identificazione prevede il ricorso a test fenotipici e tecniche molecolari quali il sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale nonché metodi di tipizzazione quali PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (10, 11).

### **Fattori di patogenicità**

Gli enterococchi, ed in particolare *E. faecalis*, possono essere dotati di molteplici fattori di patogenicità che determinano la virulenza del genere ed intervengono direttamente ed attivamente nella genesi dell'evento infettivo: la sostanza aggregante, la proteina extracellulare di superficie, la produzione di superossido extracellulare, la citolisina, la gelatinasi, la parete cellulare, la capsula e l'antibiotico-resistenza. Quest'ultimo è senz'alcun dubbio quello maggiormente importante.

#### Sostanza aggregante

La sostanza aggregante, codificata dal gene *agg*, è tipica di *E. faecalis* e promuove l'adesione degli enterococchi alle superfici epiteliali, l'aggregazione tra una cellula batterica e l'altra, inducendo la formazione di ammassi dotati di una certa consistenza (17, 4, 19).

#### Proteina extracellulare di superficie

La proteina extracellulare di superficie (codificata dal gene *esp*) interviene nel meccanismo di adesione dei ceppi *vanB* di *E. faecalis* alla mucosa intestinale di diversi ospiti biologici (4, 19).

#### Superossido extracellulare

La produzione di superossido extracellulare è associata alla patogenicità dei ceppi invasivi di *E. faecium* e di *E. faecalis*. La sua funzione sembra quella di proteggere la cellula batterica dall'azione delle cellule fagocitarie (4, 17).

#### Citolisina

La citolisina è una citotossina ad attività emolitica che presenta notevoli analogie con le batteriocine, lisa i globuli rossi di equino e uomo, ma non quelli di bovino e pecora (questi ultimi di norma presenti nei terreni per l'isolamento selettivo). È stata riscontrata la sua presenza nel 60% dei ceppi di *E. faecalis* isolati da campioni clinici e ne è stata ampiamente confermata l'attività tossica e batteriocinica (4, 17).

#### Gelatinasi

La gelatinasi è una metallo-endopeptidasi extracellulare di peso molecolare pari a 30 kDa prodotta in particolare da *E. faecalis* e direttamente codificata dal gene

*gelE*. È stata tuttavia confermata solo una sua parziale e marginale correlazione con la virulenza del genere: in uno studio condotto da Kawalec e collaboratori è stato dimostrato come la presenza della gelatinasi regoli la produzione di una proteasi extracellulare della serina (*extracellular serine protease*), codificata dal gene *sprE* e che sembra appartenere alla famiglia delle endopeptidasi glutaminiche comuni agli stafilococchi (*extracellular serine protease e glutamyl endopeptidase I staphylococcal group*) (4, 17, 20).

### Parete cellulare

I peptidoglicani e l'acido lipoteicoico, costituenti propri della parete cellulare dei microrganismi Gram-positivi, espletano la loro funzione patogena inducendo una risposta infiammatoria associata alla loro stessa interazione diretta con le cellule macrofagiche (17).

### Capsula

La capsula, di natura polisaccaridica e prodotta da determinati stipiti, impedisce da un lato l'interazione del batterio con i fagociti inibendo conseguentemente l'attivazione del complemento, dall'altro consente alla superficie microbica di aumentare la propria idrofilia esprimendo un efficace contributo antimacrofagico. È opportuno sottolineare come risulti assai improbabile che la capsula venga prodotta nel momento in cui il microrganismo colonizza gli enterociti della mucosa intestinale (17).

### **Antibiotico-resistenza**

La diffusione dell'antibiotico-resistenza è determinata dalla presenza, a livello di genoma batterico, di plasmidi e trasposoni, ovvero piccole porzioni di genoma capaci, nel primo caso di replicare autonomamente, nel secondo di muoversi ed inserirsi in punti diversi dello stesso organismo.

I trasposoni, diversamente dai plasmidi, possono esistere solo come strutture inserite nel genoma, cromosomiale o plasmidico. La loro presenza, infatti, è stata rilevata nel cromosoma batterico e nel cosiddetto "fattore R", un particolare plasmide che contiene contestualmente sia i geni che codificano per l'antibiotico-resistenza sia i geni che codificano per l'attitudine all'attività coniugativa, cioè al trasferimento del plasmide stesso da un ceppo batterico ad un altro (21, 22).

La resistenza antibiotica multipla plasmidica e trasposone mediata viene acquisita dagli enterococchi con diversi meccanismi di coniugazione e si può manifestare nei confronti di tetracicline, eritromicina, cloramfenicolo, di elevate concentrazioni di aminoglicosidi,  $\beta$ -lattamici, del complesso quinopristina-dalfopristina e dei glicopeptidi, in particolare verso la vancomicina.

L'antibiotico-resistenza può essere anche intrinseca e manifestarsi nei confronti di basse concentrazioni di aminoglicosidi (gentamicina e streptomina),  $\beta$ -lattamici e glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) (4).

Nella Tabella 2 sono riassunti i fattori di patogenicità degli enterococchi.

FATTORI DI PATOGENICITÀ	PROPRIETÀ
Sostanza aggregante ( <i>agg</i> )	adesione agli epiteli ( <i>E. faecalis</i> )
Proteina extracellulare di superficie ( <i>esp</i> )	adesione agli epiteli ( <i>E. faecalis</i> )
Superossido extracellulare	attività antifagocitaria ( <i>E. faecalis</i> )
Capsula	attività antifagocitaria ( <i>E. faecalis</i> )
Citolisina	attività emolitica ( <i>E. faecalis</i> )
Parete cellulare	Induzione della risposta infiammatoria ( <i>E. faecalis</i> )
Gelatinasi ( <i>gelE</i> )	<i>E. faecalis</i>
ANTIBIOTICO-RESISTENZA	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>

**Tabella 2:** Fattori di patogenicità degli enterococchi

### Resistenza agli antibiotici glicopeptidi

Gli antibiotici glicopeptidici vengono impiegati nel trattamento delle infezioni nosocomiali sostenute da batteri Gram-positivi, inclusi i generi *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium*. Comprendono principalmente teicoplanina e vancomicina; quest'ultima, da un punto di vista clinico, rappresenta il principio attivo più rilevante. La vancomicina è stata scoperta negli anni '50 come metabolita secondario prodotto da *Streptomyces orientalis* (riclassificato con il nome di *Amycolatopsis orientalis*), un microrganismo ad habitat terricolo. Grazie alla sua notevole efficacia in fase di trattamento delle classiche infezioni sostenute da Gram-positivi, che non rispondevano ad altri protocolli terapeutici, la vancomicina è stata rapidamente riconosciuta come antibiotico di prima scelta. Il suo impiego è stato limitato in seguito agli effetti tossici osservati in alcune circostanze e riportabili alla somministrazione di preparazioni antibiotiche non omogenee e, in tali situazioni cliniche, è stato sostituito da un antibiotico  $\beta$ -lattamico di terza generazione, la meticillina, dimostratasi attiva nei confronti di microrganismi resistenti alle penicilline. Il conseguente e facilmente ipotizzabile eccessivo utilizzo della meticillina ha tuttavia indotto lo sviluppo di ceppi batterici resistenti, in particolare nei confronti di *Staphylococcus aureus* (MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), fatto questo che ha favorito l'inevitabile ripristino terapeutico della vancomicina. Negli anni '80, comunque, lo stesso fenomeno verificatosi per la meticillina si ripropose anche per la vancomicina, con l'insorgenza del fenomeno della resistenza. Lo sviluppo della resistenza alla vancomicina ha creato non pochi problemi nella scelta dei protocolli terapeutici dal momento che questo antibiotico è considerato, ad oggi, l'unico ancora efficace nel trattamento delle infezioni enterococciche nell'uomo. Ne è inevitabilmente conseguito un forte incremento delle attività di ricerca mirate ad individuare nuovi agenti antibatterici, approfondendo contestualmente le conoscenze relative agli intrinseci meccanismi molecolari che stanno alla base del fenomeno (3, 23, 24).

La resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi si manifesta grazie alla presenza, nel genoma batterico, di sei distinti geni indicati con la sigla *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, codificanti per i rispettivi pattern fenotipici.

***vanA***: codifica per un alto livello di resistenza alla vancomicina. Si tratta del primo fenotipo ad essere stato studiato e si presenta localizzato sul trasposone Tn1546 di *Enterococcus faecium*. Questo trasposone è spesso posizionato a livello plasmidico e ciò consente il suo trasferimento, mediante coniugazione, ad altri enterococchi e talvolta anche ad altre specie batteriche, tra cui *Streptococcus pneumoniae* resistente alle cefalosporine di terza generazione, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente, *Listeria* (3, 23, 24).

***vanB***: codifica per un moderato livello di resistenza alla vancomicina dimostrando invece una netta sensibilità nei confronti della teicoplanina. *vanB* è stato isolato prevalentemente da *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis*. Il gene si trova spesso localizzato sul cromosoma batterico e, di conseguenza, non può essere trasferito ad altri microrganismi. Raramente si posiziona su elementi genetici mobili, come i plasmidi o il trasposone Tn1549, quest'ultimo di più difficile identificazione (3, 23, 24). Tuttavia è stata di recente dimostrata, mediante PCR, la presenza di *vanB* in 6 diversi ceppi di microrganismi bacillari Gram-positivi anaerobi appartenenti ai generi *Clostridium* e *Ruminococcus*, isolati da campioni di feci di pazienti ospedalizzati che erano risultati negativi agli enterococchi vancomicina-resistenti. Questo riscontro atipico ha portato a risultati falsi positivi alla lettura della PCR (25).

***vanC***: codifica per bassi livelli di resistenza intrinseca alla vancomicina (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*) (3, 23, 24).

***vanD***: codifica per la resistenza alla vancomicina e alla teicoplanina (*E. faecium*), sembra essere localizzato su un cromosoma e non trasferibile da un enterococco all'altro (3, 23, 24).

***vanE* e *vanG***: scoperti recentemente, codificano per bassi livelli di resistenza alla vancomicina e mostrano spiccata sensibilità alla teicoplanina (*E. faecalis*) presentando analogie con il fenotipo VanC (3, 23, 24).

In sintesi è possibile asserire che la sostituzione dei normali precursori dei peptidoglicani a sequenza terminale D-ala-D-ala, con precursori modificati terminanti con la sequenza D-alanina-D-lattato (*D-ala-D-lac*) per i fenotipi VanA, VanB, VanD e con la sequenza D-alanina-D-serina per i fenotipi VanC, VanE, VanG, corrisponde al meccanismo di base responsabile della resistenza ai glicopeptidi.

### Resistenza agli antibiotici aminoglicosidi

Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di due livelli di resistenza nei

confronti degli antibiotici aminoglicosidi: moderati livelli di resistenza, con valori di MIC pari a 62-500 µg/ml, ed elevati livelli di resistenza (HLR: *high-level resistance*) caratterizzati da valori di MIC  $\geq$ 2000 µg/ml e riconducibili alla produzione di enzimi in grado di inattivare gli aminoglicosidi stessi. La resistenza che gli enterococchi mostrano nei confronti degli aminoglicosidi si manifesta con meccanismi diversi. La resistenza alla gentamicina e ad altri aminoglicosidi (amikacina, kanamicina, tobramicina e netilmicina) deriva dalla presenza dell'enzima 2''-fosfotransferasi-6'-acetiltransferasi (ACC(6')-I/APH(2'')-I), codificato dal gene *aac(6')-aph(2'')*. Alcuni studi hanno inoltre confermato l'esistenza di diversi plasmidi implicati nella trasmissione della resistenza alla gentamicina, per esempio, il frammento Tn924. La resistenza alla streptomina, invece, è stata osservata soprattutto nei ceppi di *Enterococcus* produttori dell'enzima streptomina-adeniltransferasi e può risultare anche di origine ribosomiale, in seguito ad una specifica mutazione che rende i ribosomi resistenti all'azione inibitoria della streptomina. Infine la resistenza alla kanamicina è determinata dalla produzione dell'enzima 3'-fosfotransferasi (APH(3')-III), codificato dal gene *aph(3')-IIIa*, che esplica la sua funzione eliminando il sinergismo tra gli agenti attivi sulla parete cellulare e l'amikacina ed agisce fosforilando il gruppo idrossilico in posizione 3'. I risultati di alcune ricerche hanno rilevato un maggior livello di resistenza alla gentamicina, streptomina e kanamicina in stipiti di *Enterococcus faecalis* rispetto a quanto si riscontri in ceppi riportabili ad *Enterococcus faecium* (3, 23).

### Resistenza agli antibiotici $\beta$ -lattamici

La resistenza intrinseca nei confronti degli antibiotici  $\beta$ -lattamici costituisce un carattere tipico del genere *Enterococcus*. Gli enterococchi vengono distinti in due categorie: produttori di penicillasi e non produttori di penicillasi. Tra questi ultimi, *E. faecium* presenta elevati livelli di resistenza nei confronti della penicillina e dell'ampicillina: è necessaria infatti una concentrazione pari o maggiore a 16-64 µg/ml per inibirne la crescita, contrariamente a quanto si verifica nel caso di *E. faecalis* la cui crescita è inibita da una concentrazione molto più ridotta degli stessi antibiotici (1-10 µg/ml). Il meccanismo alla base della resistenza alle penicilline è rappresentato dalla produzione di particolari enzimi localizzati a livello di parete cellulare coinvolti nella crescita e nella divisione delle cellule batteriche, ovvero le proteine a bassa affinità leganti le penicilline (*low-affinity* PBP: *penicillin-binding proteins*). Il meccanismo con cui si sviluppa la resistenza non è stato ancora definitivamente chiarito, pur venendo associato ad una carenza di autolisina. Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, che legano le PBP, inattivano le autolisine batteriche responsabili della distruzione dei legami covalenti presenti nella parete cellulare batterica e scatenano batteriolisi. Nell'ambito degli enterococchi produttori di penicillasi, *Enterococcus faecalis* rappresenta il ceppo isolato più frequentemente. La penicillasi enterococcica è codificata dal gene *aph(2'')-Ia/aac(6')-Ie* a localizzazione plasmidica e si manifesta, in particolare, nei ceppi che esibiscono elevati livelli di resistenza nei confronti della gentamicina (2, 3, 23).

## Resistenza alla streptogramina

Le streptogramine rientrano in un gruppo di antibiotici naturali prodotti da ceppi di *Streptomyces* e sono caratterizzati da una struttura chimica e da un meccanismo d'azione del tutto simili a quelli propri di macrolidi e lincosamidi.

Trovano impiego nel trattamento delle infezioni sostenute da stipti riportabili ad *Enterococcus faecium*. Il complesso quinopristina-dalfopristina costituisce una miscela idrosolubile che deriva dall'associazione di due streptogramine: la streptogramina A (dalfopristina) e la streptogramina B (quinopristina). Queste molecole agiscono legando i ribosomi batterici ed inibendo la sintesi proteica con un meccanismo del tutto irreversibile. Mediante tecniche di biologia molecolare, riportabili a PCR e PFGE, è stato possibile individuare i geni presenti nel DNA degli enterococchi coinvolti nel determinismo della resistenza verso questa famiglia di antibiotici. Tra le diverse specie di *Enterococcus*, quelle di maggior interesse sono risultate *faecium* e *faecalis*. *Enterococcus faecalis* ha dimostrato di possedere resistenza intrinseca nei confronti del complesso quinopristina-dalfopristina, mentre *Enterococcus faecium* diviene resistente acquisendo attivamente i geni che codificano per questo carattere (17, 20).

Nella seguente Tabella (Tabella 3) sono invece riassunte le caratteristiche di antibiotico resistenza negli enterococchi

RESISTENZA INTRINSECA	RESISTENZA ACQUISITA
$\beta$ -lattamici (in particolare: penicilline penicillasi-resistenti e cefalosporine)	Elevate concentrazioni di $\beta$ -lattamici, per alterazione delle PBP o per produzione di $\beta$ -lattamasi
Basse concentrazioni di aminoglicosidi	Elevate concentrazioni di aminoglicosidi
Clindamicina	Glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina)
Fluorochinoloni	Tetracicline
	Eritromicina
	Fluorochinoloni
	Rifampicina
	Cloramfenicolo
	Acido fusidico
	Nitrofurantoina

**Tabella 3:** Resistenza agli antibiotici negli enterococchi (3)

## **Epidemiologia**

La conseguenza inevitabile dell'utilizzo inappropriato e talvolta scorretto degli antibiotici, sia in medicina umana che veterinaria, è rappresentata dallo svi-

luppo e dalla diffusione di microrganismi resistenti, commensali e patogeni, tra cui quelli appartenenti proprio al genere *Enterococcus* (28).

Da quanto riportato in bibliografia relativamente alla diffusione di questi batteri, è possibile operare una netta distinzione tra la situazione rilevabile in Europa e quella riportabile negli Stati Uniti.

In Europa, infatti, il problema può essere inquadrato nell'ambito strettamente zootecnico nel quale gli antibiotici vengono frequentemente addizionati alla razione allo scopo di promuovere la crescita degli animali. Molte di queste sostanze sono analoghe agli antibiotici comunemente impiegati nei protocolli terapeutici ed esplicano la loro azione a livello intestinale, modificandone la flora microbica. Un esempio è dato dall'avoparcina, un glicopeptide simile alla vancomicina, impiegato a lungo come promotore di crescita nell'alimentazione di varie specie da reddito quali bovini, suini e specie avicole, ed in seguito bandito dall'Unione Europea per aver favorito la selezione dei ceppi di enterococco glicopeptidi-resistenti, come documentato da diversi studi condotti in diversi Paesi Europei, tra cui anche l'Italia. È stato inoltre osservato come, in seguito al ritiro dell'avoparcina, la colonizzazione intestinale da parte di ceppi di enterococco vancomicina-resistenti sia diminuita in maniera significativa, in particolar modo nella specie avicole (4, 28, 29, 30).

Negli Stati Uniti, invece, il problema interessa principalmente l'ambito ospedaliero e deriva dall'impiego scorretto/inappropriato nei differenti protocolli terapeutici di antibiotici quali cefalosporine di terza generazione e vancomicina (4, 31). Tuttavia entrambe queste situazioni hanno portato in modo del tutto simile allo sviluppo di ceppi resistenti, con particolare riferimento a quelli vancomicina-resistenti (VRE: *vancomycin-resistant enterococci*). Questi ceppi particolarmente virulenti sono stati isolati per la prima volta in Europa nel 1986 e, immediatamente dopo, è stato descritto il primo caso clinico a St. Louis negli Stati Uniti. In precedenza la presenza di VRE non era mai stata adeguatamente monitorata perché gli enterococchi non venivano inquadrati come possibili patogeni (4, 30, 31).

Gli animali da reddito sono considerati i principali serbatoi (*reservoir*) di enterococchi antibiotico-resistenti, venendo questi ultimi disseminati attraverso l'escrezione fecale ed operando una susseguente massiva contaminazione ambientale. Il ciclo epidemiologico prevede che l'uomo possa preferenzialmente contrarre infezione per semplice contatto diretto, tuttavia un'altra possibile via di trasmissione è riconducibile ad alimenti di origine animale precedentemente contaminati. Questa identica eventualità eziopatogenetica può interessare anche gli animali da compagnia ed in particolare il cane, che può acquisire questi ceppi con le stesse modalità indicate per l'uomo (4, 6, 28, 32).

In ambito strettamente ospedaliero, invece, i soggetti più a rischio risultano i pazienti immunodepressi ricoverati presso le unità di terapia intensiva lungodegenti e sottoposti per lunghi periodi a terapia antibiotica ad ampio spettro. Questi possono contrarre infezione in seguito a interventi chirurgici particolarmente invasivi, come pure per contatto con pazienti precedentemente infetti, portatori presenti nell'ambito del personale ospedaliero, strumentazione e superfici contaminate. In tali casi le conseguenze sono particolarmente gravi e riportabili ad episodi di endocardite, infezioni del tratto genito-urinario, batteriemia ed endoftalmiti (3, 4).

## Il cane come possibile serbatoio

Il tratto gastroenterico del cane, così come quello di molti altri mammiferi tra cui l'uomo, risulta colonizzato da diverse specie batteriche, comprese quelle appartenenti al genere *Enterococcus* (*E. faecalis* pare sia la specie predominante a livello fecale). La presenza di questa microflora risulta vantaggiosa all'animale, in quanto permette di prevenire potenziali infezioni sostenute da microrganismi dotati di una più spiccata invasività e patogenicità. Tuttavia, l'intestino rappresenta anche un ambiente ottimale di crescita per ceppi batterici a spiccata virulenza che possono costituire un grave e consistente pericolo per la salute dell'animale. Tra questi anche gli enterococchi che, pur essendo filogeneticamente inquadrabili come batteri commensali dell'intestino ed in genere apatogeni, in particolari condizioni possono determinare l'insorgere di severi quadri morbosi. La patogenicità è, tra l'altro, determinata dalla presenza di particolari geni che codificano per lo specifico carattere dell'antibiotico-resistenza (1, 5, 15).

Già dal secolo scorso, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza e la diffusione degli enterococchi antibiotico-resistenti sono diventati una realtà a livello sanitario sia in medicina umana che veterinaria, tanto da essere considerati un problema emergente di sanità pubblica a livello mondiale. Inoltre questi microrganismi presentano la proprietà di acquisire e trasferire facilmente i geni codificanti per questo carattere anche ad altre specie batteriche, in particolare *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus lactis* e *Streptococcus* spp. (1, 7, 9). Tuttavia gli studi effettuati con lo scopo di analizzare il problema, confinando l'attenzione a livello di animali da compagnia, risultano poco approfonditi. Sarebbe quindi necessario acquisire maggiori conoscenze in materia di antibiotico-resistenza, dal momento che gli animali da affezione, vivendo a stretto contatto con i loro proprietari, diventano potenziali vettori nella trasmissione di eventuali ceppi batterici resistenti. Gli stessi possono pertanto facilmente diffondere attraverso le deiezioni anche nell'ambiente circostante, coinvolgendo di conseguenza l'uomo (5). Il primo caso di infezione da enterococco vancomicina-resistente nel cane è stato documentato in Gran Bretagna nei primi anni '90. Gli studi successivi hanno poi dimostrato come questo fenomeno non fosse così raro ed hanno confermato come il ceppo isolato con maggior frequenza fosse *E. faecium* tipo *vanA*. È possibile che la trasmissione sia avvenuta attraverso alimenti a base di carne, derivati da animali trattati con avoparcina o contaminati con materiale fecale (6, 32). Nonostante gli studi epidemiologici inerenti gli enterococchi antibiotico-resistenti debbano essere considerati insufficienti, la maggior parte della documentazione che riporta la loro presenza in animali da compagnia fa riferimento ai cani "d'azienda", che vivono a diretto e stretto contatto con altre specie animali per le quali la presenza di questi specifici stipti viene riscontrata più frequentemente (6, 7). Seppur in minor misura vi sono dei dati riferiti alla presenza di ceppi vancomicina-resistenti (VRE) isolati da cani che vivono in aree urbane: non si conosce tuttavia la modalità attraverso la quale sia avvenuta la trasmissione, in quanto questi cani non sono stati a contatto con le specie da reddito e non si sono neppure sottoposti in precedenza ad uno specifico trattamento antibiotico con vancomicina (7). Tuttavia,

da uno studio eseguito a Madrid nel 2004, il dato più rilevante emerso è che il 13% dei cani esaminati albergano ceppi di *E. faecium* vancomicina-resistenti nelle feci e che molti di questi risultano resistenti anche ad altri antibiotici normalmente utilizzati nella pratica veterinaria. A partire da tale dato si evince che i cani abitanti nelle aree urbane potrebbero essere considerati un significativo *reservoir* di *E. faecium* resistenti a molteplici fattori antimicrobici (7). Inoltre, dal momento che è stata dimostrata la trasmissione diretta di enterococchi dagli animali da reddito all'uomo, si può aggiungere che anche il cane potrebbe rappresentare un'importante fonte di ceppi VRE. La facile ed efficace contaminazione per semplice contatto diretto con le feci potrebbe contribuire alla trasmissione orizzontale di quei geni specifici che codificano per la resistenza tra stipiti di enterococco animali ed umani. A conferma di ciò in un recente studio americano è stata descritta la netta somiglianza tra il trasposone Tn1546 appartenente a ceppi di *E. faecalis* vancomicina-resistenti isolati da campioni di urine di cani ed il trasposone Tn1546 proprio di ceppi di *E. faecalis* vancomicina-resistenti isolati da campioni clinici umani. Questo importante dato epidemiologico potrebbe sostenere la tesi secondo la quale lo scambio tra determinanti di resistenza tra enterococchi di origine canina e umana sia effettivamente possibile (33). Infatti, nonostante i risultati di svariati studi di tipizzazione bio-molecolare possano suggerire che gli enterococchi si comportino come agenti ospite-specifico o ospite adattato, queste rilevazioni non precludono un possibile trasferimento animale-uomo del carattere antibiotico-resistenza. Di fatto, essendo gli enterococchi di derivazione animale facilmente reperibili in alimenti di origine animale e di conseguenza agevolmente ingeriti dall'uomo, gli stipiti di *Enterococcus* animali probabilmente contribuiscono, grazie ad opportuni geni di resistenza e ad altri fattori di patogenicità, all'incremento della sopravvivenza degli stessi nell'ospite uomo. Il rinvenimento di specifici cloni isolati a partire da infezioni nosocomiali non preclude, infatti, che enterococchi provenienti da serbatoi animali contribuiscano a favorire queste stesse varianti clonali. È assai probabile che si verifichi l'ingresso in ambiente ospedaliero di enterococchi provenienti da altri *reservoir* (ad esempio nuovi pazienti oppure alimenti di origine animale contaminati). Questi dati dimostrano l'urgenza e la necessità di un attento monitoraggio circa la presenza degli enterococchi antibiotico-resistenti e l'esigenza di un controllo continuo della diffusione dei determinanti di resistenza negli animali da compagnia in generale, e nel cane in particolare, come elemento sostanziale nel programma di sorveglianza dei ceppi VRE.

## CONCLUSIONI

Lo scopo di questa raccolta di dati è stato quello di approfondire le conoscenze sul genere *Enterococcus*, al fine di analizzare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, il cui sviluppo è considerato universalmente correlato allo "scorretto" utilizzo degli antibiotici, sia in ambito veterinario che in quello proprio della medicina umana. Se da un lato è ormai riconosciuta una diretta correlazione tra utilizzo di antimicrobici e prevalenza del fenomeno resistenza prevalentemente in ambito zootecnico, il problema dello sviluppo e della diffusione del fenomeno negli animali da compagnia e le possibili conseguenti ripercussioni sull'uomo non sono ancora state

completamente analizzate ed approfondite. È necessario quindi studiare più attentamente il problema, per capire se gli animali da compagnia possano essere definiti come veri e propri possibili serbatoi di microrganismi patogeni anche per l'uomo e, nell'eventualità, dimostrare se siano o meno in grado di trasferire i loro caratteri di resistenza, comportando un possibile grave rischio sanitario (1, 8). Ne deriva l'urgenza di creare un'attiva e fitta rete di sorveglianza mirata a monitorare principalmente gli enterococchi antibiotico-resistenti, valutandone la distribuzione geografica e seguendo l'evoluzione dinamica, soprattutto in termini di variabilità genica di quei fattori codificanti per questo carattere, sia nella popolazione animale e umana che a livello ambientale. Questa logica appare fondamentale in una più ampia visione che conduca a rivalutare positivamente la profilassi antibiotica come utile ed essenziale strumento di tutela della salute pubblica.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la sig.ra Cinzia Reverberi ed il sig. Roberto Lurisi per l'assistenza tecnica prestata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rodrigues J., Poeta P., Martins A., Costa D. (2002). The importance of pets as reservoir of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. *J. Vet. Med.*, B 49: 278-280.
2. Saribas S., Bagdatli Y. (2004). Vancomycin tolerance in enterococci. *Chemother.*, 50: 250-254.
3. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microb. Rev.*: 686-707.
4. Mundy L.M., Sahn D.F., Gilmore M. (2000). Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Focus, Clin. Microb. Rev.*: 513-522.
5. De Graef E.M., Decostere A., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2004). Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. *Microb. Drug Resist.*, 10(1): 65-69.
6. Devriese L.A., Ieven M., Goossens H., Vandamme P., Pot B., Hommez J., Haesebrouck F. (1996). Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*: 2285-2287.
7. Herrero I.A., Fernández-Garayzábal J.F., Moreno M.A., Domínguez L. (2004). Dogs Should Be Included in Surveillance Programs for Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 42(3): 1384-1385.
8. Prescott J.F., Hanna W.J.B., Reid-Smith R., Drost K. (2002). Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can. Vet. J.*, 43: 107-116.
9. Leclerc H., Devriese L.A., Mossel D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicator of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 459-466.



24. Pootoolal J., Neu J., Wright G.D. (2002). Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 381-408.
25. Ballard S.A., Grabsch E.A., Johnson P.D.R., Grayson M.L. (2005). Comparison of three PCR primer sets for identification of vanB gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by vanB-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*: 77-81.
26. Hayes J.R., Wagner D.D., English L.L., Carr L.E., Joseph S.W. (2005). Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55: 123-126.
27. Hershberger E., Oprea S.F., Donabedian S.M., Perri M., Bozigar P., Bartlett P., Zervos M.J. (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob Chemother.*, 55: 127-130.
28. Van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14(4):327-335.
29. Del Grosso M., Caprioli A., Chinzari P., Fontana M.C., Pezzotti G., Manfrin A., Di Giannatale E., Goffredo E., Pantosti A. (2000). Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb. Drug Resist.*, 6(4): 313-318.
30. Wegener H.C., Aarestrup F.M., Jensen L.B., Hammerum A.M., Bager F. (1999). Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Perspectives, Emerg. Infect. Dis.*, 5(3): 329-335.
31. Treitman A.N., Yarnold P.R., Warren J., Noskin G.A. (2005). Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2003). *J. Clin. Microb.*, 43(1): 462-463.
32. Heuer O.E., Hammerum A.M., Collignon P., Wegener H.C. (2006). Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Food Safety*, 43: 911-916.
33. Simjee S., White D.G., McDermott P.F., Wagner D.D., Zervos M.J., Donabedian S.M., English L.L., Hayes J.R., Walker R.D. (2002). Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J. Clin. Microb.*, 40(12): 4659-4665.