

# CONFRONTO TRA STIPI TI DI ENTEROCOCCHI RESISTENTI ALLA TETRACICLINA ISOLATI DA FECI DI PECORE ALLEVATE NELLA ZONA DEL PARCO NAZIONALE DEI MONTI SIBILLINI E FORMAGGI TIPICI DELLA STESSA AREA GEOGRAFICA

## ***COMPARISON BETWEEN TETRACYCLINE RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM SHEEP AND TYPICAL CHEESE IN THE GEOGRAPHICAL AREA OF "PARCO NAZIONALE DEI MONTI SIBILLINI"***

Cambiotti V., Garofalo D., Cenci Goga B.T.

Master in Sanità Pubblica Veterinaria e Igiene degli Alimenti, Università degli Studi di Perugia

### **SUMMARY**

Enterococchi were isolated from sheep faeces and cheese taken in the «Parco nazionale dei monti Sibillini»; then they were submitted to the antibiotic susceptibility test and to the PCR reaction to amplify *tet M* and *tet O* genes. The analysis showed that 23,64% of Enterococchi from sheep and 30,77% from cheese were resistant to tetracycline; 14 strains from sheep and 5 from cheese contained *tet M* and *tet O* genes as genetic determinants of resistance. These results allow to say that resistant bacteria and genes have the possibility to be transferred from animals to derived food; therefore reducing antibiotic use in farm animals could affect the amount of resistant microorganisms that can reach human beings using this way of diffusion.

### **KEYWORDS**

antibiotic, resistance, tetracycline, sheep, cheese.

### **INTRODUZIONE**

Gli enterococchi sono germi di forma sferica, gram positivi, catalasi negativi. Nei preparati microscopici si ritrovano a coppie, a brevi catenelle o come cellule singole; sono immobili, con un metabolismo aerobio-anaerobio facoltativo. Per le loro caratteristiche antigeniche erano stati originariamente classificati tra gli streptococchi del gruppo D di Lancefield, poi distinti in un nuovo genere a partire dal 1984. Tali microrganismi sono ampiamente diffusi a livello ambientale e fanno parte della normale flora microbica intestinale di uomo ed animali (1, 2). Dal punto di vista clinico rivestono una certa importanza come patogeni nosocomiali in quanto, pur non essendo particolarmente virulenti, sono intrinsecamente poco sensibili a molti antibiotici ed acquistano facilmente nuovi deter-

minanti di resistenza (1, 2, 3). Sebbene ci siano diversi studi relativi alla diffusione di germi resistenti negli animali e negli alimenti (2, 4), è interessante valutare la prevalenza del fenomeno in bestiame al pascolo, allevato in maniera estensiva, in un ambiente poco contaminato dai farmaci; oltre che in alimenti come il formaggio pecorino di Norcia, con determinate caratteristiche di tipicità e genuinità, non comuni a molti altri prodotti reperibili sul mercato. Tuttavia, lo studio ha mostrato dei livelli simili nelle due tipologie di campione e piuttosto elevati di resistenza nei confronti della tetraciclina, risultato che permette di ipotizzare una certa diffusione del fenomeno negli animali ed il suo trasferimento nel latte e nei prodotti derivati.

### **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato svolto nel Parco nazionale dei

monti Sibillini, che comprende un gruppo montuoso situato nel centro Italia ed esteso da nord a sud per 30 km. L'area di prelievo dei campioni di feci interessa prevalentemente le zone di Frontignano, Norcia e Castelluccio di Norcia; mentre i formaggi, fabbricati con latte crudo ed aventi diversi periodi di stagionatura (compresi tra maggio e novembre 2010) sono stati acquistati a novembre 2010 e provengono da Norcia e Castelluccio di Norcia. La raccolta delle feci è stata effettuata tra il 2008 ed il 2010 utilizzando guanti sterili e buste sterili "presto chiuso". Dalle feci sono stati isolati 55 enterococchi, 26 dai formaggi, dopo screening per la resistenza a 4 µg/ml di tetraciclina. *Isolamento degli enterococchi* - Ciascun campione di feci e formaggio è stato diluito 1:10 in acqua peptonata (PW Difco, Detroit, MI, USA) ed omogeneizzato in Stomacher 400 (PBI, Milano) prima dell'allestimento delle diluizioni decimali in soluzione fisiologica. Le diluizioni sono state inoculate sul terreno di coltura utilizzando 0,1 ml per la semina in superficie. E' stato utilizzato il terreno Slanetz & Bartley (Oxoid, Milano, Italy) incubato a 35 °C per 4 ore ed a 44°C per 44 ore: tutte le colonie rosso scuro o marrone e bianche o rosa sono state conteggiate come *Enterococcus spp.* *Screening mediante Replica Plating* (5, 6)- Ciascuna piastra di Slanetz & Bartley che mostrava crescita di un numero di colonie ben separate, compreso tra 30 e 50, è stata replicata, secondo il metodo originariamente descritto da Lederberg, su Mueller Hinton Agar addizionato di tetraciclina in ragione di 4 µg/ml. La presenza di una sola

colonia resistente a 4µg/ml di antibiotico è stata valutata come campione positivo. Tutte le colonie cresciute sono state trasferite in brodo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid) e congelate a -80 °C fino alle successive analisi. *Antibiogrammi* - La conferma della resistenza alla tetraciclina è stata effettuata secondo il metodo di diffusione in agar. *PCR* - E' stato progettato un primer degenerato per l'evidenziazione dei geni tetM e tetO: le sequenze dei primer, le dimensioni dei prodotti della PCR, le condizioni e il protocollo di amplificazione sono indicati nella Tabella 1. L'amplificazione del DNA è stata condotta su di un volume di 25 µL, utilizzando: 12,5 µL di RED Taq (10 mM di Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% di gelatina, 0,2 mM di ciascun deossiribonucleosidetrifosfato), 0,5 microL (1 microM) di ciascun primer, 5 µl di DNA estratto, 6,5 µl H<sub>2</sub>O. Sono stati utilizzati in ogni reazione di PCR 100ng di DNA di *E. faecalis* tetM come controllo positivo. Le reazioni di PCR sono state effettuate su Mastercycler (Eppendorf, AG, Hamburg, DE). Gli amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, 1% contenente bromuro di etidio (0,5µg/ml); la corsa è stata effettuata ad un voltaggio di 100V per circa 1 ora; le bande sono state visualizzate con il transilluminatore a raggi UV (Fotodine 3-3102 Celbio) (5, 6). *Analisi statistica* - I dati sono riportati come tasso di rilevazione (numero di stipiti isolati/numero di stipiti resistenti).

**Tabella 1.** Condizioni di amplificazione

Coppia primer	Geni bersaglio	Sequenza nucleotidica 5'-3'	Amplificato (bp)	Programma
tetMO-1 tetMO-2	tetM, tetO	ACY CGT ATA YTR TTT CAT GCA CT CCN TCC ATA ACC GCA TTT TG	1112	95°C x 3' (95°C x 1'; 48°C x 1'; 72°C x 1') x 30 72°C x 10'

## RISULTATI

Dei 55 stipiti isolati dalle pecore, 13 sono risultati resistenti (23,64%) e 6 parzialmente resistenti (10,91%) alla tetraciclina; mentre dei 26 enterococchi provenienti dai formaggi, 8 resistenti (30,77%) e 4 parzialmente resistenti (15,38%). Dopo l'analisi mediante PCR 14 ceppi di pecora e 5 di formaggio hanno mostrato positività.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I livelli di resistenza riscontrati in questo stu-

dio, nonostante l'esiguità del campione analizzato, permettono di ipotizzare un flusso di migrazione dei germi e geni di resistenza dagli animali domestici, in cui si effettuano trattamenti con antibiotici e dove quindi la flora microbica è sottoposta a pressione selettiva da parte di questi, all'uomo, in maniera diretta, mediante carne, latte e derivati oltre che indiretta, grazie alla contaminazione dei campi e quindi dei prodotti agricoli ad opera delle deiezioni del bestiame. Bisogna infatti considerare che gli antibiotici vengono frequentemente utilizzati come presidi terapeutici in medicina veterinaria ed in passato rappresentavano anche dei validi promotori di crescita (7, 8, 9). Dal

2006 tale impiego è stato bandito nella UE; tuttavia in molti paesi dell'Est Europa non esiste una regolamentazione e si presume che l'uso sommerso di tali farmaci sia elevato, tanto più che in diversi stati non appartenenti all'Unione Europea non è necessaria nemmeno la prescrizione veterinaria per gli antibiotici, acquistati direttamente dall'allevatore come prodotti da banco (9). Le conseguenze di tutto ciò sulla salute umana sono serie, considerando il fatto che le derrate alimentari attraversano le frontiere e con esse anche i germi resistenti (9). Le infezioni dell'uomo sostenute da batteri resistenti presenti negli alimenti sono piuttosto diffuse (quasi 200.000 casi/anno in Europa di tossinfezioni da *Campylobacter* spp. e oltre 100.000 di salmonellosi) e si curano con difficoltà, soprattutto se resistenti ai principali antibiotici impiegati in medicina umana, spesso largamente utilizzati anche in campo veterinario (ad esempio nel 2008 nella UE la resistenza ai fluorochinoloni era del 18% nei germi agenti di salmonellosi nel pollo) (9). Risulta particolarmente importante quindi prevenire lo sviluppo di resistenza limitando l'uso degli antibiotici, bandendone l'impiego come promotori di crescita nei paesi dove ancora è in vigore, promuovendo piani di sorveglianza sull'uso dei farmaci e sui livelli di resistenza e facilitando lo sviluppo di una collaborazione attiva e costruttiva tra il settore agro-zootecnico ed il sistema sanitario.

## BIBLIOGRAFIA

1. Frazzon A.P.G., Gama B.A., Hermes V., Bierhals C.G., Pereira R.I., Guedes A.G., D'Azevedo P.A., Frazzon J. (2010). Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 365-370
2. Pedonese F., Nuvoloni R., D'Ascenzi C., Gerardo B., Armani S., Rindi S., (2007). Determinazione della sensibilità agli antimicrobici di enterococchi isolati da alimenti di origine animale. *Università di Pisa, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, LIX/20 p.47-54
3. Cenci Goga B., Vizzani A., Monticelli C., Nicchiarelli I., Sechi P., Pisano I. (2009). Prevalenza di stipiti antibiotico resistenti di *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. in caprioli (*Capreolus capreolus*) e cervi (*Cervus elaphus*) nel Parco Nazionale dei Monti Sibillini. *Rivista dell'associazione Italiana veterinari igienisti*, 5.3 (09), 28-33
4. Mariano V., McCrindle CME, Cenci-Goga B., Picard JA. (2008). A case-control study to determine whether river water can spread tetracycline resistance to unexposed impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park (South Africa). *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan;75(1):113-8. Epub 2008 Oct 31
5. Cenci Goga BT, Sechi P, Catanese B. (2010). Resistenza alla tetraciclina in stipiti di enterococchi isolati da feci di cervo (*Cervus elaphus*) in un parco nazionale a confronto con stipiti di enterococchi isolati da feci di pecore allevate: uno studio trasversale. *Atti SISVet*, in corso di stampa
6. Soncini G, Sechi P, Pisano I, Monticelli C, Nicchiarelli I, Cenci Goga B. (2009). Studio caso-controllo sull'epidemiologia di stipiti antibiotico resistenti di *Escherichia coli* ed *Enterococcus* spp. in pecore e ungulati selvatici nel parco nazionale dei monti sibillini. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie* LXIII, 416-418
7. Barbosa T.M., Levy S.B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates* (2000) 3, 303-311
8. Schwartz S., Chaslus-Dancla E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32 (2001) 201-225
9. World Health Organization (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe - <http://www.euro.who.int>, visitato, Aprile 2011

## RINGRAZIAMENTI

Ricerca eseguita con finanziamento MIUR - Cooperlink «Cooperazione Interuniversitaria Internazionale», A.F. 2010-2011.