

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



Tesi di Dottorato di Ricerca in  
**AMBIENTE, PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA (XIX° CICLO)**  
(Coordinatore: Prof. Claudio Buccelli)

*Caratterizzazione fenotipica di Enterococchi GRE da fonti alimentari*

COORDINATORE  
Prof. Claudio Buccelli

DOTTORANDA  
Dott.ssa Francesca Pennino

RELATORE  
Prof.ssa Ida Torre

Anno Accademico 2006 – 2007

## INTRODUZIONE

Gli enterococchi sono cocchi Gram-positivi generalmente considerati poco patogeni. Il loro habitat naturale è rappresentato dal tratto gastrointestinale degli uomini e degli animali ma, grazie alla loro elevata tolleranza al calore e alla capacità di sopravvivere anche in condizioni avverse possono colonizzare suolo, acque superficiali, piante, alimenti di origine vegetale ed animale (1, 14, 31). Gli Enterococchi trovano applicazione come starter nei prodotti lattiero caseari sia perché svolgono potenzialmente un ruolo importante nella determinazione delle proprietà del prodotto finito, contribuendo attivamente con le loro attività enzimatiche ai processi di lipolisi e proteolisi delle frazioni di latte impiegato, sia perché producono sostanze (batteriocine) che sono in grado di inibire lo sviluppo di altri microrganismi patogeni, come per esempio *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, e sono quindi anche elementi particolarmente vantaggiosi per garantire un'adeguata sicurezza igienica durante le fasi fermentative di maturazione del formaggio (1). Gelsomino et al. Franz et al. attribuiscono agli enterococchi anche caratteristiche probiotiche (8). Gli enterococchi rappresentano oggi la seconda causa più comune delle infezioni del sangue contratte nei reparti di terapia intensiva degli ospedali statunitensi. Nel 1999, oltre il 25% delle infezioni da enterococchi nei reparti di terapia intensiva sono state causate da VRE, un dato in crescita, del 47% rispetto al 1994 (5, 6, 14). Secondo i dati forniti dal National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System dei Centers for Disease Control and Prevention, gli Enterococchi occupano il terzo posto tra gli agenti maggiormente responsabili di infezioni nosocomiali batteriemiche (7) dopo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (5,6).

L'aumento di infezioni nosocomiali da Enterococchi è dovuto all'ampio utilizzo di antibiotici a largo spettro, all'aumento di pazienti gravemente malati (31, 11) e all'abilità (unica e potente) di questi microrganismi di acquisire resistenze ad antibiotici attraverso il trasferimento di plasmidi, trasposoni e scambi cromosomiali (14).

Esempi di antibiotico resistenza intrinseca si hanno verso cefalosporine,  $\beta$ -lattamasi, sulfonamidi, e bassi livelli di clindamicina e aminoglicosidi, mentre esempi di resistenza acquisita si osservano con l'utilizzo di cloramfenicolo, eritromicina, alti livelli di clindamicina e aminoglicosidi, tetracicline, alti livelli di  $\beta$ -lattamasi, fluoroquinolonici e glicopeptidi come la vancomicina. Purtroppo, numerosi studi hanno evidenziato, a partire dagli anni '80, che un numero sempre crescente di enterococchi ha acquisito la resistenza ad alti livelli di aminoglicosidi (MIC >500 mg/l per gentamicina e MIC >2.000 mg/l per streptomina), divenendo così invulnerabili all'azione battericida dovuta all'associazione antibiotica (11). A

complicare ulteriormente la già difficile situazione è stata l'emergenza in diversi Paesi (Belgio, Francia, Germania, Paesi Bassi, Spagna, Regno Unito, Stati Uniti e Italia) di ceppi resistenti ai glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) (12). L'emergenza del fenomeno della glicopeptido-resistenza comporta gravi problemi clinici legati, da una parte, alla non disponibilità di farmaci efficaci per il trattamento delle infezioni provocate da microrganismi multiresistenti (gli enterococchi glicopeptido-resistenti sono resistenti anche ad ampicillina e aminoglicosidi) e, dall'altra, alla possibilità che i geni che codificano per la glicopeptido-resistenza possano diffondersi ad altri microrganismi Gram-positivi, come ad esempio *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (13, 31).

La problematica dell'antibiotico resistenza microbica costituisce una concreta e crescente minaccia per la salute umana, in quanto le antibiotico resistenze vengono rilevate sempre più frequentemente anche in enterococchi presenti su prodotti alimentari di largo consumo. Tra i gruppi batterici diffusi negli alimenti, gli enterococchi sono quelli che fino ad ora hanno maggiormente richiamato l'interesse dei ricercatori, in quanto è stato dimostrato che essi possono essere coinvolti in eventi di trasferimento genico orizzontale a causa delle loro caratteristiche strutturali intrinseche (9). La trasmissione della resistenza antibiotica da prodotti di origine animale ai batteri è stata ben documentata. Si pensa che essa possa derivare dall'uso terapeutico di agenti antimicrobici nella medicina veterinaria o dall'impiego di promotori della crescita (antibiotic growth promoters, AGPs) nel convenzionale ingrassamento animale. Tipico esempio è l'avoparcina, un glicopeptide correlato con la vancomicina e la teicoplanina, che nel 1997 è stato bandito dall'Unione Europea perché sospettato di indurre resistenze crociate nei batteri. Dagli animali i geni resistenti possono arrivare all'uomo attraverso la catena alimentare. Per quanto riguarda i prodotti di origine vegetale invece i meccanismi non sono stati ancora ben compresi. Alcuni ritengono che la trasmissione della resistenza ai batteri del suolo, tra cui gli enterococchi, avvenga attraverso l'utilizzo di acqua di irrigazione sottotrattata, concime o antibiotici impiegati per la cura delle piante. Questo trasferimento orizzontale potrebbe ritrasferire resistenza agli animali o agli uomini attraverso i raccolti (14, 15). Gli enterococchi resistenti (ad es. alla vancomicina), una volta ingeriti col cibo risiedono in modo innocuo nell'intestino umano e possono causare solo occasionalmente infezioni. Gli enterococchi sono caratterizzati da una serie di naturale e acquisita resistenza. In particolare, alcuni ceppi presentano una naturale resistenza per i chinolonici (verso i quali presentano anche un'intermedia sensibilità), per bassi livelli di cefalosporine e aminoglicosidi e per più alti livelli di polimyxina, lincomicina e clindamicina.

Inoltre essi sono capaci di acquisire resistenze ai macrolidi, tetracicline, chloramphenicolo, trimethoprim / sulfamethoxazole, rifampicina e ampicillina. A partire dagli anni '80, un numero sempre crescente di enterococchi ha acquisito la caratteristica di resistenza ad alti livelli di penicillina, gentamicina, streptomicina, vancomicina e teicoplanina (agenti antibatterici terapeutici). L'aumento di enterococchi resistenti ai glicopeptidi (GRE) è di particolare importanza perché la vancomicina e la teicoplanina sono gli antibiotici di uso esclusivamente ospedaliero, a somministrazione parenterale, impiegati più spesso nel trattamento di gravi infezioni nosocomiali causate da cocci Gram positivi multiresistenti tra cui gli enterococchi.

Alcuni studiosi ritengono che l'utilizzo di fertilizzanti, di acqua di irrigazione sottotrattata e di antibiotici per curare le piante, possano essere i responsabili dell'acquisizione della resistenza da parte di alcuni microrganismi del suolo, i quali potrebbero passare agli uomini o direttamente attraverso alimenti consumati crudi o indirettamente attraverso gli animali (catena alimentare).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di isolare, identificare e studiare i profili di suscettibilità antibiotica di membri del genere *Enterococcus* isolati da campioni di verdure fresche a foglia consumate crude. Si è scelto di focalizzare la nostra attenzione proprio su tali campioni perché numerosi sono i lavori volti a studiare i profili resistenti di enterococchi isolati da alimenti di origine animale e pochi invece quelli riguardanti enterococchi isolati da alimenti di origine vegetale.

## **MATERIALI E METODI**

Da febbraio 2006 sono stati analizzati 7 diversi tipi di verdure per un totale di 150 campioni. I campioni sono stati reperiti in esercizi commerciali di varie dimensioni. In particolare sono stati analizzati: 39 lattughe, 27 sedano, 27 prezzemolo, 18 scarola riccia, 9 scarola a foglia larga, 9 rucola, 12 incappucciata, 9 radicchio. L'isolamento è stato effettuato mediante arricchimento in Peptone Water e successivo passaggio in coltura su Enterococcosel agar. L'identificazione è stata effettuata con metodi biochimici (Api 20Strep). La suscettibilità agli antibiotici è stata valutata con il metodo della disco diffusione (metodo Kirby-Bauer), in accordo con le linee della NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Sono stati testati i seguenti antibiotici: amoxicillina/acido clavulanico (20 µg), ampicillina (10 µg), vancomicina (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloramfenicolo (30 µg), cefalotina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (120 µg), imipenem (10 µg), kanamicina (30 µg), levofloxacina (5 µg), linezolid (30 µg), meticillina (5 µg), nitrofurantoina (300 µg), norfloxacina (10 µg), penicillina (10 µg), rifampicina (5 µg), streptomina (300 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), trimetropim/ sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg).

## RISULTATI

Dei 150 campioni esaminati durante tutto il periodo di studio (febbraio 2006 – ottobre 2007), 105 (70%) sono risultati positivi per la ricerca di *Enterococcus spp.* La tabella 1 mostra la frequenza di positività per ciascun alimento e la resistenza ai glicopeptidi e agli aminoglicosidi.

Tabella 1: Distribuzione di Enterococchi VRE, SRE, TRE e GRE per ciascun tipo di alimento campionato

		Enterococchi	VRE	TRE	GRE	SRE
Campione	N° totale	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)
Lattuga	39	31 (79.5)	15 (48.2)	23 (75)	31 (100)	31 (100)
Sedano	27	22 (81.6)	10 (44.5)	7 (30.6)	16 (71.8)	20 (92.6)
Prezzemolo	27	26 (96.1)	15 (57.7)	20 (77.8)	20 (77.8)	26 (100)
Scarola riccia	18	11 (61.5)	8 (72.7)	2 (25)	11 (100)	8 (75)
Scarola larga	9	3 (37.0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	2 (66.6)
Rucola	9	5 (55.6)	1 (20)	0 (0)	3 (60)	2 (40)
Incappucciata	12	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Radicchio	9	6 (69.2)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)	6 (100)
TOTALE	150	109 (72.7)	50 (45.8)	52 (47.7)	90 (82.5)	100 (91.7)

VRE= Enterococchi Vancomicina resistenti SRE= Enterococchi Streptomicina Resistenti

TRE= Enterococchi Teicoplanina Resistenti GRE= Enterococchi Gentamicina Resistenti

Come mostra la Tabella 1 il sedano ed il prezzemolo sono stati gli alimenti più frequentemente risultati positivi (rispettivamente il 81.6 e il 96.1). La maggioranza dei campioni positivi per Enterococchi è risultata resistente agli aminoglicosidi (90.5% per la streptomicina e l'82.5% per la gentamicina). Il 45.8% e il 47.7% è risultato contaminato rispettivamente da ceppi VRE e TRE ed in particolare un'alta prevalenza di VRE è stata isolata dal prezzemolo (57.7%) e dalla scarola riccia (72.7%); mentre ceppi TRE sono stati trovati prevalentemente nella lattuga (75%) e nel prezzemolo (77.8%).

La tabella 2 mostra le specie isolate e le resistenze ai glicopeptidi e agli aminoglicosidi. Le specie più isolate sono state l'*Enterococcus faecium 1* (34.8%) e l'*Enterococcus faecium 2* (25.7%). La

maggioranza dei ceppi è risultata resistente agli aminoglicosidi (91.7% per la streptomina e 82.5% per gentamicina). Inoltre dallo studio è emerso che il 85.6% dei ceppi è risultato sensibile alle lattamasi, ai carbapenemici e alla penicillina.

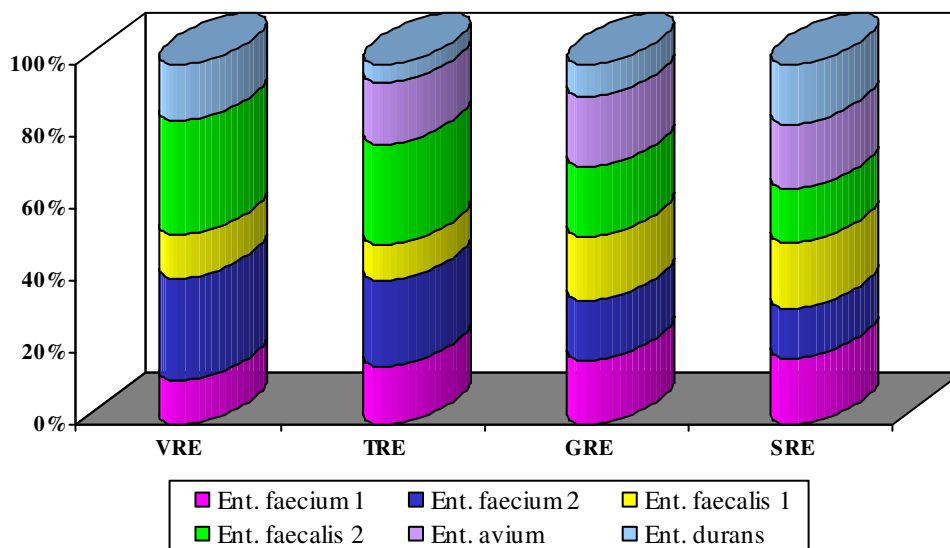
Tabella 2: Microrganismi isolati e antibiotico resistenza a glicopeptidi e aminoglicosidi

	Totale	VRE	TRE	GRE	SRE
Microrganismo	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)
<i>Ent. faecium 1</i>	38 (34.8)	12 (31.6)	18 (47.3)	35 (92.1)	38 (100)
<i>Ent. faecium 2</i>	28 (25.7)	21 (75)	20 (71.4)	24 (85.7)	22 (78.5)
<i>Ent. faecalis 1</i>	13 (12)	4 (30.8)	4 (30.8)	12 (92.3)	13 (100)
<i>Ent. faecalis 2</i>	6 (5)	5 (83.3)	5 (83.3)	6 (100)	5 (83.3)
<i>Ent. avium</i>	4 (3.7)	0 (0)	2 (50)	4 (100)	4 (100)
<i>Ent. durans</i>	20 (18.8)	8 (40)	3 (15)	9 (45)	18 (90)
TOTALE	105 (100)	50 (45.8)	52 (47.7)	90 (82.5)	100 (91.7)

VRE= Enterococchi Vancomicina resistenti SRE= Enterococchi Streptomina Resistenti  
TRE= Enterococchi Teicoplanina Resistenti GRE= Enterococchi Gentamicina Resistenti

Un'alta percentuale di resistenza ai glicopeptidi si è riscontrata in ceppi di *Ent.faecium 2* (rispettivamente 75% e 71.4%) e di *Ent.faecalis 2* (83.3% sia per vancomicina che per teicoplanina) (Figura 1).

Figura 1: Distribuzione di Enterococchi resistenti a glicopeptidi e aminoglicosidi.



I

La problematica dell'antibiotico resistenza microbica costituisce una concreta e crescente minaccia per la salute umana, in quanto le antibiotico resistenze vengono rilevate sempre più frequentemente anche in enterococchi presenti su prodotti alimentari di largo consumo.

I risultati emersi da questo studio, hanno evidenziato la presenza nelle verdure crude da noi esaminate di stipiti di enterococchi ed enterococchi resistenti. Gli alimenti quindi potrebbero essere una possibile causa del trasferimento di tali microrganismi resistenti alla flora batterica intestinale umana con successive alterazioni delle sue normali funzioni.

Hamilton-Miller e Shah (6) studiarono la suscettibilità antibiotica della flora enterobatterica di insalata, trovando un alto grado di resistenza all'ampicillina. Johnston e Jaykus (14) isolarono, identificarono e caratterizzarono i profili della resistenza antibiotica di diverse specie di enterococchi isolate da prodotti freschi. In questo studio la specie più isolata fu *Enterococcus faecium* (52%) e le più alte percentuali di resistenza furono trovate per ciprofloxacina e tetracicline.

Dalla nostra ricerca è emerso che su 150 campioni analizzati, 109 (72.7%), sono risultati positivi per la ricerca di *Enterococcus spp.* In particolare tra i campioni analizzati, la lattuga risulta essere la verdura più frequentemente ritrovata positiva (28.4%).

In accordo con lo studio di Johnston e Jaykus la specie più isolata è stata l'*Enterococcus faecium* I (34.8%). Maggior fonte di riflessione risulta essere l'analisi della suscettibilità antibiotica degli enterococchi isolati. Complessivamente, tali microrganismi si sono mostrati resistenti alla meticillina (appartenente al gruppo delle penicilline) per il 75.2%, alla kanamicina (appartenente agli aminoglicosidi) per l'87.1% e alla cefalotina (appartenente a cephems) per il 53.2%. E' da notare come questi risultati coincidano con le resistenze intrinseche degli enterococchi.

Le percentuali di sensibilità più alte si sono avute invece per l'ampicillina (94.2%), l'amoxicillina / acido clavulanico (95%), l'imipenem (92%), la penicillina (88.3%) e il trimetropim/sulfamethoxazole (80.8%). Questo risultato coincide con la sensibilità riportata per gli enterococchi.

Interessante può risultare un confronto con i risultati ottenuti dallo studio di Hayes e collaboratori fatto sulla carne. In generale la prevalenza di enterococchi resistenti agli antibiotici negli animali da allevamento e nella loro carne è alta (maggiore del 60%). Hayes e collaboratori, usarono gli stessi antibiotici utilizzati nel nostro studio e videro che enterococchi resistenti comunemente contaminano carne venduta al dettaglio e la loro resistenza riflette l'uso di agenti antimicrobici nella produzione di tali alimenti. Il pattern di resistenza agli antibiotici tra i due



studi è simili; ciò che cambia è il grado di resistenza antibiotica che nei vegetali è più basso di quello della carne. E' importante tener presente che mentre nello studio di Hayes e collaboratori i prodotti animali sono comunemente cotti prima di essere consumati, ciò teoricamente inattiva la maggior parte della flora saprofito, incluso gli enterococchi. Nel nostro caso la verdura è spesso consumata cruda di conseguenza la flora saprofito potrebbe non modificare e arrivare più facilmente all'uomo attraverso la catena alimentare. Dati come quelli presentati in questo studio offrono evidenze che possono essere di pieno aiuto nell'identificazione di temi di studi futuri visto l'importanza che sta assumendo oggi la problematica dell'antibiotico resistenza microbica. Tale problematica è una concreta e crescente minaccia per la salute umana perché gli alimenti potrebbero essere responsabili della trasmissione dei microrganismi antibiotico resistenti all'uomo. In realtà quale è il ruolo del cibo nella trasmissione di questi microrganismi non è ancora chiaro

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Giraffa G., Carminati D., Neviani E. (1997) Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60, 732-738.
- 2) Corti G., Giganti E., Paradisi F., Nicoletti P. : Urinary tract infections in the city of Florence: epidemiological considerations over a twenty-year period. *Eur J Epidemiol*, 1993 ; 9 : 335-40.
- 3) Chenoweth C., Shaberg D. : The epidemiology of Enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1990 ; 9(2) : 80-9.
- 4) Shaberg D.R., Culver D.H., Gaynes R.P. : Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*, 1991 ;91(Suppl 3B) : 72-5S.
- 5) Emori T.G., Gaynes R.P. : An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, 1993 ; 6 : 428-42.
- 6) Gelsomino R., Huys G., D'Haene K., Vancanneyt M., Cogan T.M., Franz C.M.A.P., Swings J.: Antibiotic Resistance and Virulence Traits of Enterococci isolated from Baylough, an Irish Artisanal Cheese. *J. of Food Protection*, 2004; 9: 1948-1952.
- 7) Progetto di ricerca Diffusione di batteri lattici antibiotico resistenti in formaggi del commercio
- 8) Eliopoulos G.M., Eliopoulos C.T.: Therapy of enterococcal infections.*Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1990; 9: 118-26.
- 9) Bartoloni A., Stefani S., Orsi A. *et al.*: High-level amonoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures. *J Antimicrob Chemother*, 1992; 29: 729-31.
- 10) Woodford N., Johnson A.P., Morrison D., Speller D.C.E.: Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8: 585-615.
- 11) Anonymous: Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-Unites States. *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1993; 42: 597-9.
- 12) Lynette M., Johnston and Lee-Ann Jaykus: Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species Isolated from Produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004; 3133-3137.
- 13) Monno R., Costi A., De Nicolò T., Corrente M.: Uso di antibiotici in campo veterinario: un ulteriore contributo all'emergenza di resistenze nei batteri. *Giornale italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica*, 2003; 7:109-114.
- 14) Koneman EW .Testo-Atlante di Microbiologia Diagnostica (seconda edizione) Ed A.

Delfino medicina-scienze 1995.

- 15) Simon S.L.: The human intestinal microflora. *Dig. Dis. Sci*; 31:147S-162S, 1986.
- 16) Devriese, L.A., Pot, B. and Collins, M:D: (1993) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 399-408.
- 17) Teixeira, L.M., Facklam, R.R., Steigerwalt, A.G., Pigott, N.E., Merquior, V.L.C. and Brenner, D.J: (1995) Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *J. Clin Microbiol.* 33,1520-1523.
- 18) Ulrich, A. and Muller, T. (1998) Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Appl. Microbiol.* 84, 293-303.
- 19) Park, Y.J., Oh, E.J., Kirn, B.K., Kirn, S.M. and Shim, S.I. (1999) Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 269-273.
- 20) Schleifer, K.H. and Killper-Balz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 31-34.
- 21) De Vaux, A., Laguerre, G., Divies, C. and Prevost, H. (1998) *Enterococcus asini*, sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 383-387.
- 22) Muller T., Ulrich A., Ott E.M. and Muller M. (2001) Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* 91, 268-278.
- 23) Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 2002; 163-171.
- 24) Arthur M., Courvalin P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents chemother* 37: 1563-1571.
- 25) Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* 1998; 278: 46-53.
- 26) Jawetz E. Principles of antimicrobial drug action. In: Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*, 6th ed. Lange Med, Book, 1998: 671-9.
- 27) Hill KE, Top EM. Gene transfer in soil systems using microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; 25:319-29.
- 28) Wellington EM, van Elsas JD. Genetic interactions among micro organisms in the

- natural environment. Pergamon Press, London, UK 1992.
- 29) Shanahan PMA et al. The global impact of antibiotic-resistant bacteria: their sources and reservoirs. *Rev Med Microbiol* 1994; 5:174-82.
  - 30) Levy SB. Antibiotic-resistant bacteria in food of man and animals. In *Antimicrobials in Agriculture*, Ed. M. Woodbine, Butterworth, London, 1984: 521-31
  - 31) Taylor D.J. (1995). *Pig Diseases*, 6<sup>th</sup> ed. DJ Taylor, 31 North Birbiston Rd, Lennoxton, Glasgow G67 7LZ, ISBN 0-9506932 5-1,384 pp.
  - 32) Schwartz S., Chaslus-Dancia E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance *Vet Res* 32 (3-4) 201-225.
  - 33) Prescott JF, Sivendra R, Barnum DA. (1978). The use of bacitracin in the control of experimentally induced necrotic enteritis in chickens. *Canad Vet J*; 19: 181-7.
  - 34) Kaukas A, Hinton M., Linton AH. (1988). The effect of growth promoting antibiotics on the fecal enterococci of healthy young chickens. *J Appl Bacteriol* 64: 57-64.
  - 35) Kjerulf A, Pallesen L, Westh H. (1996). Vancomycin-resistant enterococci at a large university hospital in Denmark. *APMIS*; 104: 475-9.
  - 36) Klare I., Heier H., Claus H. et al (1995). Enterococcus faecium strains with VanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal food stuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist*; 1: 265-72.
  - 37) Uttley A.H, Collins C.H, Naidoo J, Gorge R.C. (1998). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1, 57-588.
  - 38) Leclercq R, Merlot E, Duval J, Courvalin P. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 319: 157-160.
  - 39) Schnabel E.L., Jones A.L., (1999). Distribution of Tetracycline Resistance Genes and Transposons among Phylloplane Bacteria in Michigan Apple Orchards *Appl Environ Microbiol*, 65 4898-4907
  - 40) Nwosu VC. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms 152 421-430.
  - 41) Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroek L.: Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International J. of Food Microbiology* 88 (2003) 311-314.
  - 42) Arthur M., Reynolds P., Courvalin P.: Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology* 4, (1996).

- 43) Austin DJ et al. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. Proc Nat Acad Sci 1999; 96: 1152-6.