

Identificazione degli Enterococchi e dei geni di resistenza Van tramite il sistema Phoenix e PCR

Lavoro di Diploma di:

**Astrea Rossetti,
Formazione Tecnico in Analisi Biomediche
Scuola Superiore Medico Tecnica, Locarno
2008**

Lavoro svolto presso l'Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona

**Responsabili:
Antonella Demarta
AnnaPaola Caminada**

2. Riassunto

Introduzione:

Gli Enterococchi sono batteri molto diffusi in natura e presenti in forma commensale negli essere umani. Da qualche anno a questa parte però sono riconosciuti sempre più come agenti patogeni causanti importanti infezioni nosocomiali. Il problema delle infezioni nosocomiali è aggravato dal fatto che sempre più ceppi diventano resistenti agli antibiotici glicopeptidici (come la vancomicina) e quindi difficili da curare. Pertanto un obiettivo del mio lavoro di diploma era quello di stabilire la ripartizione delle specie di Enterococchi e l'incidenza dei geni di resistenza, in Ticino. Inoltre si è voluto valutare la validità della Multiplex PCR per l'identificazione simultanea della specie e dei geni di resistenza alla vancomicina.

Materiale e metodi:

Sono stati analizzati 121 ceppi di Enterococchi, la routine ha ritenuto 31 ceppi significativi e 90 non significativi per il caso. Per questi ultimi ceppi sono stati eseguiti dei Phoenix. Per 118 ceppi si è continuato con una PCR 16S, una Multiplex PCR per i geni *van* ed una Multiplex PCR per i geni *ddl* *E. faecalis* ed *E. faecium*. Dopo ogni PCR è stata eseguita un'elettroforesi. Per i risultati dubbi si è continuato con il sequenziamento del ceppo, poi immesso in una banca dati e confrontato con le sequenze conosciute. 3 ceppi si sono rivelati appartenenti alla famiglia degli *Streptococcus*, quindi non sono più stati presi in considerazione.

Risultati:

Entrambe le tecniche d'identificazione (Phoenix, Multiplex *ddl*) hanno mostrato che la specie più frequente è *E. faecalis* (90.7%), seguita a molta distanza da *E. faecium* (6.8%). Dei 118 ceppi analizzati solo 3 hanno mostrato dei geni di resistenza, tutti della classe *vanC*.

Conclusioni:

In Ticino come nel resto del mondo le specie più isolate sono *E. faecalis* ed *E. faecium*. Si è potuto escludere un incremento di altre specie nei materiali clinici. Inoltre si è constatato che il problema dei VRE in Ticino non è particolarmente diffuso. Con questo lavoro si è notato che la Multiplex per l'identificazione simultanea della specie e dei ceppi di resistenza non è un metodo valido, in quanto non permette di discriminare bene sia la specie che la resistenza (se presente), per questo motivo il lavoro è stato svolto con due Multiplex separate.

Abstract

Introduction:

Enterococci are widespread bacteria in nature and present in commensal form in human beings. For some years now they have been increasingly recognized as pathogens causing important nosocomial infections. The problem of nosocomial infections is compounded because more and more strains become resistant to glycopeptide antibiotics (such as vancomycin) and hence difficult to treat. Therefore one aim of my diploma study was to establish the breakdown of the species of Enterococci and the incidence of the resistance genes, in Ticino. Furthermore we wanted to assess the validity of the Multiplex PCR for the simultaneous identification of the species and the genes of vancomycin resistance.

Materials and Methods:

121 strains of Enterococci were analysed, the routine considered 31 significant strains and 90 not significant for the case. For these 90 strains, Phoenix identification was performed. For 118 strains the work continued with a PCR 16S, a Multiplex PCR for the genes *van* and a Multiplex PCR for the genes *ddl* *E. faecalis* and *E. faecium*. After every PCR an electrophoresis was performed. For the doubtful results we continued with a sequencing of the strains, which were then placed in a database and compared with known sequences. 3 strains were revealed belonging to the family of *Streptococcus*, hence they were not longer considered.

Results:

Both the techniques of identification (Phoenix and Multiplex *ddl*) showed that the more frequent species is *E. faecalis* (90.7%), followed at a distance by *E. faecium* (6.8%). Of 118 strains analysed, only 3 showed resistance genes, all of the *vanC* class.

Conclusion:

In Ticino as in the rest of the world the species most often isolated are *E. faecalis* and *E. faecium*; we were able to exclude an increase of other species in the clinical materials. Furthermore we saw that the problem of VRE in Ticino is not particularly widespread. With this work, we were able to show that the Multiplex for the simultaneous identification of the species and the resistance is not a valid method, because it does not allow discrimination of the species and the resistance (if it is present), for this reason the work was made with 2 separate Multiplex.