

# PROVA DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI CONFRONTI DI 70 CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. (*S. ENTERITIDIS*, *S. TYPHIMURIUM*, *S. HADAR*, *S. VIRCHOW* E *S. INFANTIS*) DI ORIGINE AVICOLA

Fiorentini L.<sup>1</sup>, Taddei R.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì*

## Abstract

Salmonellosis remains one of the most frequent food-borne diseases worldwide. The emergence of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from food can potentially compromise the treatment of these infections. This investigation was conducted to determine the antibiotic resistance profile of the *Salmonella* isolates. In total 70 strains were investigated. Isolated *Salmonella* were characterized by serotyping and susceptibilities were determined for 22 antimicrobial drugs using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay. All the isolates were susceptible to ofloxacin, amoxicillin-clavulanic acid, cefalotine, cefuroxime, ciprofloxacin, but high rates of resistance were observed for several other drugs, especially for *Salmonella virchow*. This study underlines the need for integrated surveillance systems of antibiotic resistance that consider isolates from the animal reservoirs and the food vehicles.

## Riassunto

La Salmonellosi è ancora una delle più frequenti cause di tossinfezione alimentare nel mondo. L'aumento dell'antibiotico-resistenza osservata nei ceppi di *Salmonella* isolati può compromettere il trattamento terapeutico di queste infezioni. Nel corso di questo studio venivano condotte prove di antibiotico-resistenza nei confronti di 70 ceppi di *Salmonella* isolati ed identificati sierologicamente, nel corso dell'attività diagnostica, a partire da matrici di origine avicola. Il saggio di sensibilità agli antibiotici veniva valutato col sistema della Minima Concentrazione Inibente (MIC) utilizzando un pannello di 22 antibiotici. *Salmonella virchow* presentava resistenza del 100% verso un maggior numero di antibiotici rispetto agli altri sierotipi. Alcuni antibiotici fluorochinoloni,  $\beta$ -lattamici e cefalosporine di prima e seconda generazione (ofloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefuroxime, ciprofloxacin), inibivano il 100% dei ceppi impiegati. Questo studio sottolinea la necessità di monitoraggio dell'antibiotico-resistenza dei ceppi patogeni isolati dagli animali e dagli alimenti da essi prodotti.

## Introduzione

La salmonellosi è una delle zoonosi di maggior interesse sia dal punto di vista epidemiologico che economico, poiché il patogeno infetta un elevato numero di animali ed è responsabile di numerosi episodi di malattia di origine alimentare nell'uomo. Il rapporto dell'*European Food Safety Authority* (EFSA) 2008, individua la *Salmonella* come seconda causa di tossinfezione alimentare più diffusa nell'uomo in Europa (1). Negli ultimi 50 anni si è assistito ad un aumento sempre più frequente e preoccupante del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, dovuto all'uso indiscriminato e spesso inadeguato di antibiotici, sia in campo umano, per la cura di malattie infettive, sia in quello animale, poiché molti sono i trattamenti di massa in allevamenti intensivi per

la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche, con conseguente impossibilità di un accurato controllo della posologia.

Il problema legato all'uso degli antibiotici negli allevamenti non riguarda solo il rischio di permanenza nelle carni di residui, ma anche la selezione di popolazioni batteriche resistenti verso questi principi attivi (4).

Questo studio si propone di valutare l'antibiotico-resistenza in stipti di *Salmonella infantis*, *virchow*, *hadar*, *typhimurium* ed *enteritidis*, isolati da matrici di origine avicola nel corso della routine diagnostica.

### **Materiali e metodi**

Nel corso del 2008, presso il laboratorio di batteriologia della Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna), venivano eseguite prove di antibiotico-resistenza nei confronti di 70 ceppi di *Salmonella* (*S.enteritidis*, *S.Typhimurium*, *S.hadar*, *S.virchow* e *S.infantis*), tutti isolati nel corso dell'attività diagnostica da diverse matrici di origine avicola in circa 5 anni di attività (Tabella 1).

I ceppi venivano identificati come *Salmonella* mediante esame microbiologico con prearricchimento in acqua peptonata tamponata, arricchimento in terreni liquidi selettivi (Rappaport Vassiliadis Soy Broth e brodo selenito), semina in terreno agarizzato (Hektoen Enteric Agar), identificazione biochimica su Kligler Iron Agar (2). Dalla fine del 2007, con metodo microbiologico previsto dalla ISO (*International Standard Organization*) 6579:2002/Amd 1:Annex D: (2007) (3).

I ceppi isolati venivano poi identificati sierologicamente con metodica rapida su vetrino (identificazione degli antigeni somatici O e flagellari H) o con agglutinazione lenta a caldo per la caratterizzazione degli antigeni flagellari (H) secondo lo schema di Kauffmann-White (1).

Il saggio di sensibilità agli antibiotici veniva valutato col sistema della Minima Concentrazione Inibente (MIC) definita come la minima concentrazione, in un range di diluizioni di antibiotico, che inibisce la crescita batterica (6).

Per la prova veniva impiegato un sistema standardizzato MIC DADE BEHRING MICROSCAN<sup>®</sup>: progettato per la medicina umana, costituito da pannelli (piastre *microtiter*) contenenti 1µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano, progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di germi Gram negativi.

### **ANTIBIOTICI**

- |                                     |                                |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. cefotaxime                       | 12. cefazolina                 |
| 2. gentamicina                      | 13. aztreonam                  |
| 3. tobramicina                      | 14. ceftriaxone                |
| 4. amikacina                        | 15. cefepime                   |
| 5. ofloxacina                       | 16. ceftazidime                |
| 6. norfloxacin                      | 17. piperacillina + tazobactam |
| 7. amoxicillina + acido clavulanico | 18. piperacillina              |
| 8. imipenem                         | 19. ticarcillina               |
| 9. meropenem                        | 20. cefuroxime                 |
| 10. ceftaxime                       | 21. ciprofloxacina             |
| 11. cefalotina                      | 22. ampicillina                |

**Cefotaxime:** cefalosporina battericida di terza generazione (5).

**Gentamicina:** è un antibiotico amiglicosidico con elevata attività contro batteri Gram positivi e Gram negativi. È un potente inibitore della sintesi proteica, legandosi tenacemente alla subunità 30S dei ribosomi, con frammentazione degli stessi e morte cellulare; questa proprietà condiziona il meccanismo d'azione di tutti gli aminoglicosidi, poiché il loro funzionamento è direttamente connesso alla permeabilità di membrana propria di ogni batterio (5).

**Tobramicina:** è un antibiotico appartenente alla famiglia degli aminoglicosidi. Viene utilizzato unicamente per via intramuscolare ed endovenosa soprattutto in ambiente ospedaliero per il trattamento di infezioni sostenute da agenti "difficili": ciò in virtù del suo ampio spettro antibatterico (2).

**Amikacina:** è un antibiotico amiglicosidico di indicazione specifica contro le infezioni da Gram negativi per cui la gentamicina, molecola di prima scelta, non ha dato gli effetti sperati (5).

**Ofloxacina/ Norfloxacina:** principi attivi che appartengono alla classe dei fluorochinoloni di seconda generazione. Come tutti i chinoloni agiscono interrompendo la replicazione delle molecole dell'acido deossiribonucleico nei batteri. Viene utilizzato come terapia contro infezioni da gram negativi (5).

**Amoxicillina:** è un antibiotico appartenente alla classe dei  $\beta$ -lattamici al gruppo delle penicilline semisintetiche, viene usata da sola ed in associazione con l'acido clavulanico come antibiotico in molte infezioni sostenute da germi sensibili (5).

**Imipenem - Meropenem:** sono antibiotici betalattamici ad uso parenterale estremamente attivi con uno spettro esteso praticamente a tutti i germi gram + e gram -, sia aerobi che anaerobi (5).

**Cefoxitin:** rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di seconda generazione (5).

**Cefalotina:** rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di prima generazione (5).

**Cefazolina:** rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di prima generazione (5).

**Aztreonam:** antibiotico dei monobattami che agisce come le penicilline e le cefalosporine, inibendo la crescita batterica interferendo con la sintesi della parete batterica (5).

**Ceftriaxone:** è una cefalosporina metossiminica di terza generazione ad ampio spettro, dotata di elevata resistenza alle betalattamasi (5).

**Cefepime:** è un antibatterico del gruppo delle cefalosporine, di quarta generazione (5).

**Piperacillina - Tazobactan:** sono antibiotici del gruppo delle penicilline appartenenti alla classe dei  $\beta$ -lattamici (5).

**Ticarcillina:** è una carbossipenillina (5).

**Cefuroxime:** rientra fra le cefalosporine (agenti battericidi) di seconda generazione (5).

**Ciprofloxacina:** è il nome generico internazionale di un antibiotico sintetico del gruppo dei fluorochinoloni (5).

**Ampicillina:** è un antibiotico del gruppo delle penicilline appartenente alla classe dei  $\beta$ -lattamici (5).

Veniva allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. Centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi. Inoculazione di 0,1 ml di sospensione standardizzata in 25 ml di soluzione fisiologica. Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC DADE BEHRING MICROSCAN® con 100  $\mu$ l di sospensione batterica per pozzetto. Incubazione per 16-20 ore a 37°C in aerobiosi.

Quindi registrazione della MIC in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico, le MIC venivano registrate come maggiori-uguali ( $\geq$ ) rispetto la concentrazione più alta.

Quando non si verificava crescita in tutte le concentrazioni, le MIC venivano registrate come minori o uguali ( $\leq$ ) alla concentrazione più bassa.

## Risultati

I criteri di interpretazione dei risultati quantitativi delle MIC si basavano sui *breakpoints*, indicati e aggiornati dal *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), report 2004 (9) e dal *Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM), report 2003 (8). La conoscenza dei *breakpoints* dei vari antibiotici considerati permettevano di distinguere le categorie "sensibile e resistente": la sensibilità di un batterio ad un antibiotico è definita come la capacità di un farmaco di inibire la crescita batterica al dosaggio considerato, mentre sono resistenti quelli non inibiti dall'antibiotico testato. (7) (Tabella 2)

I risultati della prova non venivano validati in quanto non si disponeva di ceppi di riferimento di *Salmonella* di origine umana per i quali, inoltre, non si conoscevano i risultati entro valori definiti dal sistema di standardizzazione utilizzato.

***Salmonella infantis***: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 4 antibiotici (gentamicina, amikacina, meropenem, aztreonam), 1 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (aztreonam). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacin, amoxicillina-acido clavulanico, imipenem, cefalotina, ceftriaxone, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, ciprofloxacina, ampicillina, ceftaxime) (Grafico 1).

***Salmonella virchow***: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 8 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, aztreonam, piperacillina e tazobactam, piperacillina, ampicillina), 7 di questi mostravano una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, amikacina, imipenem, aztreonam, piperacillina e tazobactam, piperacillina, ampicillina). Nessun ceppo risultava resistente a 8 antibiotici (ofloxacina, amoxicillina - ac. clavulanico, cefalotina, ceftazidime, ticarcillina, cefuroxime, ciprofloxacina, ceftaxime) (Grafico 2).

***Salmonella hadar***: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 4 antibiotici (gentamicina, meropenem, ampicillina, ticarcillina), 1 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (ampicillina). Nessun ceppo risultava resistente a 11 antibiotici (cefotaxime, ofloxacina, norfloxacin, amoxicillina-acido clavulanico, imipenem, cefalotina, cefalozina, piperacillina-tazobactam, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina) (Grafico 3).

***Salmonella typhimurium***: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 6 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, piperacillina - tazobactam, ampicillina), 5 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, piperacillina - tazobactam). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacin, amoxicillina-acido clavulanico, meropenem, cefalotina, cefalozina, ceftriaxone, cefepime, ceftazidime, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina) (Grafico 4).

***Salmonella enteritidis***: la percentuale dei ceppi resistenti superava il 50% verso 7 antibiotici (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, meropenem, aztreonam,

ampicillina), 6 di questi mostrava una percentuale di resistenza del 100% (gentamicina, tobramicina, amikacina, imipenem, meropenem, aztreonam). Nessun ceppo risultava resistente a 12 antibiotici (ofloxacina, norfloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefalozina, ceftriaxone, cefepime, piperacillina-tazobactan, piperacillina, cefuroxime, ciprofloxacina, cefoxitin) (Grafico 5).

## Conclusioni

Lo studio condotto, limitatamente ai ceppi analizzati, consente di evidenziare i sierotipi di *Salmonella* maggiormente resistenti o sensibili al pannello di antibiotici considerati. *Salmonella virchow* presentava resistenza del 100% verso un maggior numero di antibiotici rispetto agli altri sierotipi. Non si notavano sostanziali differenze considerando i sierotipi con sensibilità pari al 100% verso il maggior numero di antibiotici. Alcuni antibiotici fluorochinoloni,  $\beta$ -lattamici e cefalosporine di prima e seconda generazione (ofloxacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefuroxime, ciprofloxacina), inibivano il 100% dei ceppi impiegati, indipendentemente dal sierotipo di *Salmonella*.

Gli studi sull'antibiotico-resistenza sono importanti ai fini epidemiologici e della sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. Sottolineano l'importanza del corretto utilizzo dei farmaci soprattutto negli animali da reddito, indispensabile per garantire l'efficacia delle terapie e limitare l'insorgenza di germi antibiotico-resistenti che potrebbero in seguito contaminare le derrate alimentari di origine animale. E' dunque necessario rafforzare la sorveglianza, implementare lo sviluppo di nuove terapie promuovendo strategie di prevenzione.

## Bibliografia

1. "The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008"
2. Zavarella M. Tipizzare le salmonelle. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche; 2001.
3. ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (2007).
4. <http://www.salute.gov.it/farmaciVeterinaripaginaInternaMenuFarmaciVeterinari.jsp>
5. British National Formulary, *Guida all'uso dei farmaci 4 edizione*, Lavis, Agenzia Italiana del Farmaco, 2007.
6. Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16.
7. MacGowan A.P. and Wise R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 17-28.
8. Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). *Commuiqué 3003* (Editino de Janvier 2003). Société Française de Microbiologie, Paris.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA.

**Tabella 1.** Ceppi di Salmonella isolati e relative matrici.

<b>SALMONELLA INFANTIS</b>		14	Carcassa di tacchino
n.ceppo	matrice	15	Feci pollo
1	Feci di pollo	16	Feci pollo riproduttore
2	Feci pollo		
3	Polvere pollo		
4	Feci di pollo		
5	Feci di pollo		
6	Lettiera pollo		
<b>SALMONELLA VIRCHOW</b>			
n.ceppo	matrice		
1	Piumino di pollo		
2	Tampone ambientale		
3	Carcassa pollo		
4	Tampone ambientale incubatoio		
5	Tampone ambientale incubatoio		
6	Uova embrionale pollo		
7	Tampone ambientale incubatoio		
8	Tampone ambientale incubatoio		
9	Tampone ambientale incubatoio		
10	Feci pollo riproduttore		
11	Fondi scatola pollo		
12	Piumino pollo		
13	Piumino di faraona		
14	Piumino pollo		
15	Piumino pollo		
16	Carcassa pollastra		
<b>SALMONELLA HADAR</b>			
n.ceppo	matrice		
1	Cute di tacchino		
2	Feci di pollo riproduttore		
3	Lettiera pollastra		
4	Carcassa pollo riproduttore		
5	Feci pollo riproduttore		
6	Feci pollo riproduttore		
7	Residui d'incubazione		
8	Feci di tacchino		
9	Carcassa di pollo		
10	Feci di pollo		
11	Piumino pollo		
12	Carcassa pollo		
13	Feci pollo		
<b>SALMONELLA TYPHIMURIUM</b>			
n.ceppo	matrice		
1	Carcassa tacchino		
2	Carcassa starna		
3	Uova embrionata quaglia		
4	Feci pollo riproduttore		
5	Carcassa oca		
6	Carcassa piccione		
7	Carcassa pollo		
8	Carcassa tacchino		
9	Carcassa ovaioia		
10	Carcassa fagiano		
11	Carcassa tacchino		
12	Feci pollastra		
13	Residui di incubazione di pollo		
14	Carcassa pernice Martini		
15	Carcassa di tacchino		
16	Carcassa pollo		
<b>SALMONELLA ENTERITIDIS</b>			
n.ceppo	matrice		
1	Tampone ambientale pollo incubatoio		
2	Piumino di pollo incubatoio		
3	Carcassa di pollo		
4	Carcassa di pollastra		
5	Carcassa pollo		
6	Tampone ambientale pollo incubatoio		
7	Residui d'incubazione		
8	Carcassa pollo boiler		
9	Carcassa pollo pulcini		
10	Carcassa pollo		
11	Carcassa pollo ovaioia		
12	Carcassa pollo		
13	Carcassa pollo		
14	Carcassa pollo		
15	Carcassa pollo		
16	Residui d'incubazione		

**Tabella 2.** Numero e percentuale di ceppi di Salmonella resistenti.

S. enteritidis	S. typhimurium	S. hadar	S. virchow	S. infantis	SENSIBILE < RESISTENTE ≥	*BREAKPOINT CONCENTRATION PER ENTERO-BACTERIACEAE	PRINCIPI ATTIVI
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/6 (17%)	8-64		cefotaxime
16/16 (100%)	16/16 (100%)	11/16 (69%)	16/16 (100%)	5/6 (83%)	4-16		gentamicina
16/16 (100%)	16/16 (100%)	8/16 (50%)	11/16 (69%)	2/6 (33%)	4-16		tobramicina
16/16 (100%)	16/16 (100%)	8/16 (50%)	16/16 (100%)	5/6 (83%)	16-64		amikacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	2-8		ofloxacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	0/6 (0%)	4-16		norfloxacina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	4-32		amoxicillina +ac. clavul.
16/16 (100%)	16/16 (100%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		imipenem
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		meropenem
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	2/16 (13%)	0/6 (0%)	8-32		cefoxitin
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	8-32		cefalotina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/6 (17%)	8-32		cefazolina
16/16 (100%)	2/16 (13%)	6/16 (38%)	16/16 (100%)	6/6 (100%)	8-32		aztreonam
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	2/16 (13%)	0/16 (0%)	8-64		ceftriaxone
0/16 (0%)	0/16 (0%)	3/16 (19%)	3/16 (19%)	0/16 (0%)	8-32		cefepime
2/16 (13%)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	8-32		cefazidime
0/16 (0%)	16/16 (100%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	1/6 (17%)	16-64		Piperacillina+ tazobactan
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	16/16 (100%)	1/6 (17%)	16-64		piperacillina
2/16 (13%)	2/16 (13%)	12/16 (75%)	0/16 (0%)	1/6 (17%)	8-64		ticarcillina
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/6 (17%)	2-16		cefuroxime
0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/6 (0%)	1-4		ciprofloxacina
10/16 (63%)	14/16 (69%)	16/16 (100%)	16/16 (100%)	0/6 (0%)	4-16		ampicillina

\*BREAKPOINT CONCENTRATION: criteri interpretativi secondo il Documento NCCLS M100-S14 e Rapporto 2003 del Comité de Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (8) (9).

Grafico 1

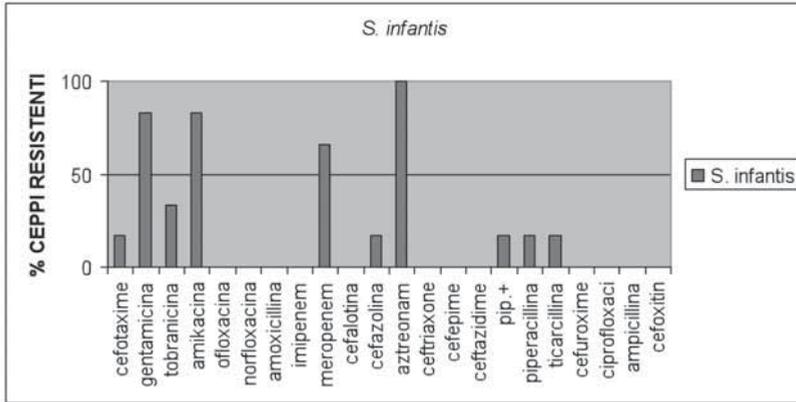


Grafico 2

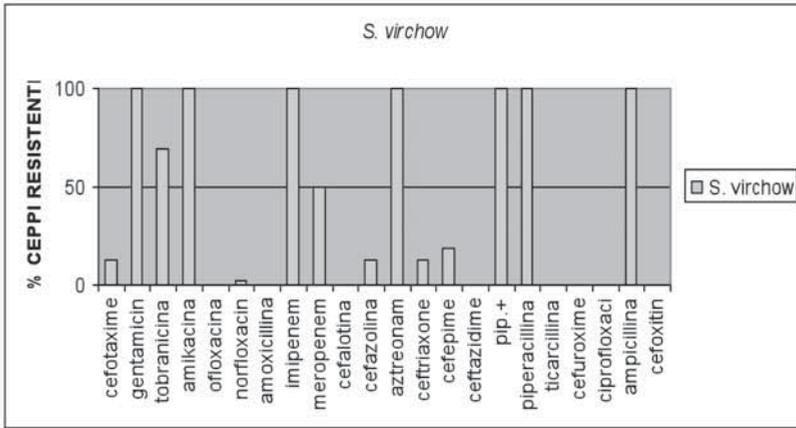


Grafico 3

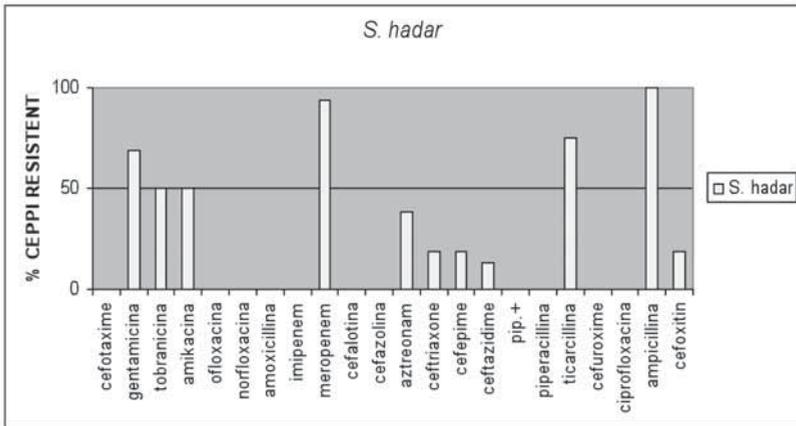


Grafico 4

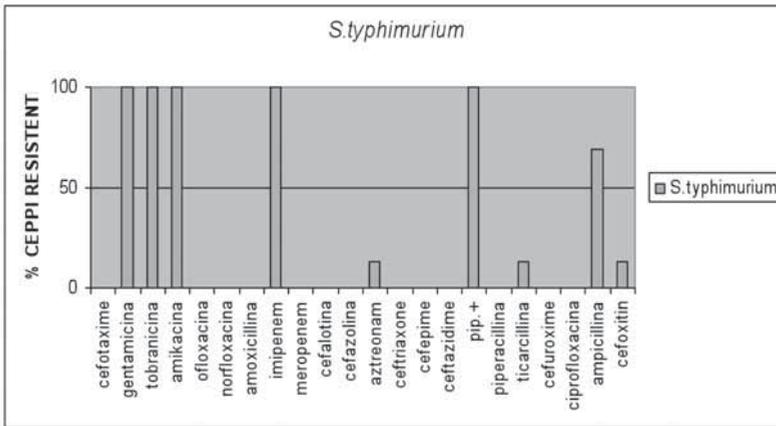


Grafico 5

