

## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FITOCSC® NEI CONFRONTI DI CEPPI DI *E. COLI* E *SALMONELLA* SPP. ANTIBIOTICO-RESISTENTI ISOLATI DAL POLLAME

Stella S.<sup>1</sup>, Martino P. A.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>3</sup>, Tirloni E.<sup>1</sup>, Cossetini C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano.

<sup>3\*</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì.

<sup>4</sup> Chemifarma SpA.

Numerosi studi hanno evidenziato, negli ultimi anni, le potenzialità dell'utilizzo degli estratti vegetali e degli oli essenziali quali sostitutivi dell'uso di antibiotici quali promotori di crescita e regolatori della microflora intestinale nel settore zootecnico. Tra gli effetti principali risulta particolarmente interessante l'attività inibitoria nei confronti di microrganismi patogeni antibiotico-resistenti vista la diffusione crescente di questo fenomeno.

Questo studio preliminare è stato svolto allo scopo di valutare l'efficacia antibatterica *in vitro* del prodotto Fito CSC®, formulato per l'aggiunta all'acqua di bevanda negli allevamenti avicoli, nei confronti di ceppi di batteri antibiotico-resistenti di provenienza avicola. Il prodotto contiene prodotti naturali botanicamente definiti: Cassia (*Cinnamomum aromaticum*; contenuto in trans-cinnamaldeide pari al 4.60%), Origano (*Origanum vulgare*) e Timo (*Thymus vulgaris*) (titolo totale 100.000 mg/kg), additivi organolettici, sostanze aromatiche e acido citrico (11.000 mg/kg) con funzione conservante. L'analisi preliminare del prodotto ha dato i seguenti risultati: sostanza secca 13%, fibra grezza 0.5%, proteina grezza < 0.5%, grassi 0%, ceneri 5%, Na 1,9%, Cl 3%, pH 4.89.

Per il test sono stati utilizzati 6 ceppi di *Escherichia coli* e 1 ceppo di *Salmonella* Typhimurium isolati da avicoli e selezionati per la presenza di resistenza antibiotica, come riportato nella tabella.

N°	Specie	Origine	Sensibilità				
			Enrofloxacin	Amoxicillina	Sulfametossazolo/ Trimetoprim	Gentamicina	Ceftiofur
1	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	S	R
2	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	R	S
3	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	S	S	R
4	<i>E. coli</i>	Pollastra	R	R	S	S	R
5	<i>E. coli</i>	Gallina ovaiola	R	R	R	S	S
6	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	S	S
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Quaglia	S	R	S	S	S

Sono state effettuate 2 serie di prove con differenti metodiche:

1<sup>a</sup> prova – Valutazione dell’abbattimento microbico su terreno solido contenente diverse concentrazioni di prodotto. Cinque aliquote di terreno Muller-Hinton Agar (MH, Oxoid) sono state preparate e addizionate, dopo la sterilizzazione, con diverse concentrazioni di prodotto: 0.25‰, 0.50‰, 0.75‰, 1‰, 2‰. È stata inoltre preparata un’aliquota di terreno non additivato quale controllo negativo.

Per ogni ceppo utilizzato, è stata allestita una sospensione a titolo noto in soluzione diluente sale/triptone (9‰); sono state quindi allestite le diluizioni seriali, che sono state seminate per inglobamento nei terreni sopra descritti. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore; successivamente è stata effettuata la conta microbica e calcolato l’abbattimento logaritmico rispetto alle piastre di controllo.

2<sup>a</sup> prova – Valutazione dell’inibizione di crescita in terreno liquido. Sono state preparate diverse serie di provette contenenti 5 ml di brodo Muller-Hinton addizionato con il prodotto ai seguenti livelli di diluizione 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 e 1/2560; è stata inoltre preparata una serie di provette contenenti il brodo non additivato, da utilizzare come controllo negativo. Per ogni ceppo batterico, è stata preparata una sospensione a titolo noto, che è stata diluita e inocolata nelle provette (concentrazione di circa 10<sup>6</sup> ufc/ml). Le provette sono state quindi incubate a 37°C per 24 ore. L’eventuale presenza di microrganismi vitali nel brodo è stata valutata prelevando 5 aliquote da 20 µl da ogni provetta, che sono state seminate per apposizione su piastre di MH agar, incubate a 37°C per 24 ore. La crescita microbica è stata valutata utilizzando il seguente punteggio: ++ (crescita di una patina batterica); + (crescita di colonie visibili); - (assenza di crescita).

Entrambe le prove sono state effettuate in doppio su tutti i ceppi.

Risultati - 1<sup>a</sup> prova. L’additivazione del terreno con il prodotto ha evidenziato un effetto antimicrobico nei confronti dei ceppi testati alla concentrazione di 2‰: l’abbattimento logaritmico medio dei ceppi di *E. coli* è stato di 0.85 Log (d.s. = 0.37), mentre nel caso del ceppo di *Salmonella* Typhimurium è stato pari a 0.6 Log; le concentrazioni inferiori non hanno evidenziato effetti significativi.

2<sup>a</sup> prova. L’inoculo del brodo con diverse diluizioni del prodotto ha permesso di rilevare un’attività battericida evidente a partire dalla diluizione 1/320, almeno per alcuni dei ceppi testati, corrispondente ad una concentrazione del prodotto di circa 3‰; alla diluizione di 1/160 (pari a circa 6‰) l’effetto battericida è apparso molto marcato per tutti i ceppi testati. I risultati sono osservabili nella tabella seguente.

Diluizione	20	40	80	160	320	640	1280	2560
Concentrazione (ml/100 l)	5000	2500	1250	625	313	156	78	39
1	-	-	-	-	++	++	++	++
2	-	-	-	+	++	++	++	++
3	-	-	-	-	+	++	++	++
4	-	-	-	-	+	++	++	++
5	-	-	-	+	+	++	++	++
6	-	-	-	-	++	++	++	++
7	-	-	-	-	++	++	++	++

Questo studio preliminare ha permesso di evidenziare l'effetto antimicrobico del prodotto sia su terreno solido che in brodo nei confronti di ceppi antibiotico-resistenti di *E. coli* e *Salmonella*. I dati ottenuti permettono di individuare un intervallo nel quale misurare la concentrazione attiva per un effetto battericida e batteriostatico del prodotto, e mettere così a punto il migliore dosaggio per esercitare un effetto positivo sull'equilibrio della microflora intestinale degli animali trattati. L'utilizzo di miscele di oli essenziali ed essenze vegetali appare come una strategia promettente nel campo dell'additivazione alimentare zootecnica, vista la combinazione di diverse attività positive (effetto antiossidante, batteriostatico, microbica) e i potenziali effetti sinergici delle diverse componenti attive.