

## **PROVE *IN VITRO* DI EFFICACIA ANTIMICROBICA DI *ALLIUM SATIVUM* NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR *ENTERITIDIS***

Casalino G., Bozzo G., D'Amico F., Camarda A., Lombardi R., Romito D., Circella E.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, S.P. Casamassima km. 3, 70010 Valenzano BA, Italia*

### **Summary**

In the last years, there has been a more prudent use of the drugs in livestock farms to reduce the risk of onset of antibiotic resistance. Therefore, the possible use of alternative products such as natural essences has been considered with greater interest. Some plants such as cinnamon, ginger, neem, turmeric, garlic, onion seem to have antiviral, antifungal, or antimicrobial activities but, despite those potentials, scientific studies about these properties are still only a few. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (S. Enteritidis) may cause disease in poultry, but it is also responsible for human food poisoning. The aim of this study has been to evaluate the efficacy of garlic against S. Enteritidis and to define the MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> values. The study was carried out *in vitro*, testing 26 S. Enteritidis strains, identified in laying hens coming from different farms. A preliminary trial of efficacy was carried out on two strains, S. Enteritidis and *Escherichia coli* respectively, using a concentration of garlic of 10 mg/ml (1 %). Later, 26 strains of S. Enteritidis in concentrations 10<sup>6</sup> UFC and 10<sup>4</sup> UFC were tested with different concentrations of garlic, ranging from 10 mg/ml to 1 mg/ml. Based on the obtained results, intermediate concentrations of garlic, 5 mg/ml to 4 mg/ml and 4mg/ml to 3mg/ml were used to test 10<sup>6</sup> UFC and 10<sup>4</sup> UFC, respectively. The obtained data were statistically analysed. The MIC<sub>90</sub> was 4.75 mg/ml for strains tested with 10<sup>6</sup> UFC concentration and 4 mg/ml for strains tested with 10<sup>4</sup> UFC concentration. The results highlight the potential efficacy of garlic to inhibit the growth of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis *in vitro*. The efficacy was dependent on the microbial concentration used. *In vivo* efficacy trials will be crucial to confirm the efficacy of garlic against S. Enteritidis and to assess the possibility of using garlic in poultry flocks to prevent the spread of the bacterium in the field.

### **INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni si è assistito ad un interesse crescente verso modalità di controllo di potenziali patogeni negli allevamenti zootecnici, alternative all'uso del farmaco al fine di ridurre il rischio di insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Sono state incrementate le misure di biosicurezza, sono stati elevati gli standard igienico-sanitari all'interno degli allevamenti, sono state regolate le densità degli animali e si è assistito ad un maggior ricorso alla profilassi vaccinale anche per la prevenzione di alcune forme batteriche.

La possibilità di ricorrere a sostanze naturali, o ai loro derivati, come alternativa all'uso di antibiotici ha inoltre spinto la comunità scientifica ad indagare circa la loro potenziale efficacia. Lo zenzero e la curcuma hanno proprietà antibatteriche

(Ibrahim et al., 2004). La cannella è stata utilizzata come rimedio naturale nei confronti di nausea, raffreddore e manifestazioni enteriche attribuite a virus. L'aloë sembra avere capacità antinfiammatorie, antiossidanti, ipoglicemizzanti e antibatteriche (Fani e Kohanteb, 2012). Il neem, grazie ai suoi componenti, presenta effetto antifungino, antipiretico, antinfiammatorio, antiartritico, diuretico, immunomodulatore (Biswass et al., 2002) e si è dimostrato inoltre efficace nei confronti di parassiti, insetti e artropodi ematofagi (Camarda et al., 2018). La propoli e il polline si sono rivelati validi antibatterici, antimicotici, antivirali e hanno dimostrato di avere poteri analgesici, antinfiammatori, immunostimolanti e antiossidanti (Babinska et al., 2012). Anche l'olio essenziale di menta ha un'efficace attività antibatterica, in particolare nei confronti di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis e *Listeria monocytogenes* (Tassou et al., 1995). Alcuni studi hanno evidenziato che l'aglio riduce la glicemia ed il colesterolo ematico ed ha attività antinfiammatoria e anticancerogena. Inoltre, l'aglio sembra avere capacità antibatteriche nei confronti di alcuni ceppi di *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* meticillino-resistenti (Jeong et al., 2014).

Considerate tali potenzialità, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia dell'aglio nei confronti di ceppi di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. e. subsp. e. ser. Enteritidis*). Questo germe è un potenziale patogeno per il pollame, in cui può indurre quadri morbosi caratterizzati da enteriti, cali di produzione e mortalità ma, attraverso la contaminazione di carne e uova, è anche responsabile di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

## **MATERIALI E METODI**

Stipiti utilizzati e allestimento delle sospensioni batteriche

Lo studio è stato condotto *in vitro* su 26 ceppi di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, precedentemente isolati in allevamenti di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo, e stoccati a -20 °C in Brucella broth e glicerolo (10%) presso la Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari.

Tutti i ceppi sono stati coltivati su Tryptic Soy Agar (TSA) (OXOID) a 37 °C *overnight*, prima dell'esecuzione dei test. A partire da ciascun ceppo, sono state allestite due sospensioni batteriche con concentrazione rispettivamente pari a  $1 \times 10^6$  UFC/ml e  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Per ottenere le concentrazioni predefinite, in accordo agli standard CLSI (2006), sono state preparate sospensioni batteriche pari allo standard 0,5 McFarland, corrispondente a  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. Le concentrazioni ottenute sono state confermate mediante diluizioni seriali e conta batterica in piastra. Dieci microlitri delle sospensioni con concentrazione pari a  $10^8$  UFC/ml sono stati seminati *a spot*, in modo da analizzare nei test la carica pari a  $10^6$  UFC mentre, per le prove condotte utilizzando la carica di  $10^4$  UFC, le sospensioni con concentrazione di  $10^8$  UFC/ml sono state diluite scalarmente in soluzione salina 0,9% sterile fino ad ottenere  $10^6$  UFC/ml e, di queste, 10  $\mu$ l sono stati seminati in ogni *spot*.

Preparazione dell'aglio e inclusione nei terreni

Per le prove di efficacia, è stato utilizzato aglio liofilizzato del commercio. La polvere liofilizzata è stata pesata e posta in acqua distillata sterile, in quantità dif-

ferenti in base alle diverse concentrazioni di aglio che ci è prefissati di testare. Le prove di efficacia sono state eseguite su agar Mueller Hinton (OXOID), ricostituito, sterilizzato in autoclave a 121 °C e successivamente portato a 50 °C prima dell'aggiunta, per inclusione al terreno, delle sospensioni di aglio alle diverse concentrazioni.

#### *Test preliminare*

Una soluzione all'1%, con concentrazione di aglio pari a 10 mg/ml, è stata utilizzata per una prima prova preliminare di efficacia su un ceppo di *Escherichia coli* (ATCC 25922) e un ceppo di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis. Dai batteri, sono state preparate sospensioni con carica di 10<sup>8</sup> UFC/ml, seminate in piastra contenente agar Mueller-Hinton semplice e addizionato con aglio, con tre diversi metodi di semina: con ansa da batteriologia, con tampone sterile e a *spot*.

La presenza di aglio nel terreno addizionato ha comportato la totale inibizione della crescita sia di *E. coli* che di *Salmonella*, indipendentemente dalla modalità di semina.

#### *Allestimento delle prove di efficacia*

Sono state allestite diverse serie di piastre di agar Mueller Hinton, contenenti concentrazioni di aglio da 10 mg/ml a 1 mg/ml (10 mg/ml; 9 mg/ml; 8 mg/ml; 7 mg/ml; 6 mg/ml; 5 mg/ml; 4 mg/ml; 3 mg/ml; 2 mg/ml; 1 mg/ml), che sono state utilizzate per testare entrambe le concentrazioni batteriche (10<sup>6</sup> UFC e 10<sup>4</sup> UFC) per ciascun ceppo. Le piastre sono state incubate a 37 °C e la lettura dei risultati è avvenuta dopo 24 ore di incubazione. Ogni esperimento è stato effettuato due volte in due giorni diversi. Sulla base dei risultati ottenuti, le cariche batteriche di 10<sup>6</sup> UFC sono state valutate con un range di concentrazioni di aglio da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml (5 mg/ml; 4,75 mg/ml; 4,5 mg/ml; 4,25 mg/ml; 4 mg/ml; 3,75 mg; 3,5 mg) e quelle pari a 10<sup>4</sup> UFC con concentrazioni da 4 mg/ml a 3 mg/ml (4 mg/ml; 3,75 mg/ml; 3,25 mg/ml; 3 mg/ml).

#### *Valutazione statistica dei dati*

I dati ottenuti dalle diverse prove di efficacia sono stati confrontati per valutarne la significatività statistica mediante il test esatto di Fisher a due code.

### **RISULTATI**

Le concentrazioni di aglio superiori o uguali a 5 mg/ml sono risultate efficaci, inibendo la crescita di tutti i ceppi, indipendentemente dalla concentrazione batterica testata. I valori MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub> sono risultati pari a 5 mg/ml in caso di carica pari a 10<sup>6</sup> UFC, mentre solo 6 di 26 ceppi (23,07 %) sono stati completamente inibiti dalla concentrazione pari a 4 mg/ml (tabella 1). Nel caso delle cariche batteriche pari a 10<sup>4</sup> UFC, MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub> sono corrisposte a 4 mg/ml, con 24 ceppi (92,3 %) inibiti nella crescita su 26 ceppi testati. La concentrazione pari a 3 mg/ml si è rivelata inefficace per tutti i ceppi analizzati in concentrazione pari a 10<sup>6</sup> UFC, mentre nel caso delle sospensioni in carica di 10<sup>4</sup> UFC, ha inibito la crescita di un solo stipite batterico.

**Tabella 1:** Efficacia *in vitro* di EAA con concentrazioni da 10 mg/ml a 1 mg/ml

Concentrazione dell'estratto (mg/ml)	N° ceppi inibiti /N° ceppi analizzati (%)	
	10 <sup>6</sup> UFC*	10 <sup>4</sup> UFC*
10	26/26 (100)	26/26 (100)
9	26/26 (100)	26/26 (100)
8	26/26(100)	26/26 (100)
7	26/26 (100)	26/26 (100)
6	26/26 (100)	26/26 (100)
5	26/26(100)	26/26 (100)
4	6/26 (23.07)	24/26 (92.3)
3	0/26 (0)	1/26 (3.84)
2	0/26 (0)	0/26
1	0/26 (0)	0/26

\* Carica batterica utilizzata

Analizzando l'efficacia delle concentrazioni di aglio intermedie, da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml per gli *spot* 10<sup>6</sup> CFU (tabella 2), la minima concentrazione inibente la crescita dei ceppi nel 90% dei casi (MIC<sub>90</sub>) è risultata pari a 4,75 mg/ml, mentre una concentrazione di 4,5 mg/ml non era altrettanto efficace ( $P < 0.001$ ), in quanto meno del 50% dei ceppi era inibito a questa concentrazione.

**Tabella 2:** Efficacia *in vitro* di EAA con concentrazioni da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml e da 4mg/ml a 3 mg/ml

Concentrazione dell'estratto (mg/ml)	N° ceppi inibiti/N° ceppi analizzati (%)	
	10 <sup>6</sup> UFC*	10 <sup>4</sup> UFC*
5	26/26 (100)	-
4,75	25/26 (96.15)	-
4,5	9/26 (34.61)	-
4,25	6/26 (23.07)	-
4	6/26 (23.07)	24/26 (92,3)
3,75	0/26 (0)	22/26 (84,61)
3,5	0/26 (0)	11/26 (42.3)
3,25	-	0/26 (0)
3	-	0/26 (0)

\* Carica batterica utilizzata

Nel caso delle concentrazioni di  $10^4$  CFU, la  $MIC_{90}$  è stata individuata a 4 mg/ml mentre la concentrazione di 3,75 mg/ml ha inibito la crescita di 22 ceppi su 26 e quindi di almeno il 50% ( $MIC_{50}$ ). L'efficacia di quest'ultima concentrazione è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella di 3.5 mg/ml ( $P = 0.034$ ). Confrontando le due differenti concentrazioni batteriche utilizzate, a 4 mg/ml si osservava un effetto inibitorio su un solo ceppo in carica pari a  $10^4$  CFU, mentre la stessa concentrazione non aveva la stessa efficacia con sospensioni di  $10^6$  CFU ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano una buona capacità inibente dell'aglio *in vitro* nei confronti di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis. Tale capacità è risultata variabile e dipendente dalla carica batterica utilizzata. L'efficacia evidenziata dovrebbe essere legata ad un'attività prevalentemente batteriostatica piuttosto che battericida di questa sostanza, in quanto i valori di MIC sono generalmente inferiori a quelli di MBC (Minima Concentrazione Battericida) (Mohsenipour e Hassanshahian, 2015).

Studi sull'efficacia antimicrobica dell'aglio, condotti su singoli ceppi per specie batterica, hanno evidenziato *in vitro* valori di MIC pari a 6,25 mg/ml per *Streptococcus mutans* (Jain et al., 2015) e per *Salmonella e. subsp. e. ser. Tiphy*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* (Andualet, 2013), valore pertanto superiore rispetto ai valori di  $MIC_{90}$  ottenuti in questo studio per i ceppi di *S. e. subsp. e. ser. Enteritidis* testati. In un altro lavoro (Gull et al., 2012), comprendente anch'esso un solo stipite di *S. e. subsp. e. ser. Tiphy*, il valore di MIC ottenuto è risultato decisamente inferiore, pari a 0,02 mg/ml. Tali divergenze potrebbero essere attribuibili alla sensibilità individuale di un determinato ceppo, visto che in questi studi non vi era stato effettuato un confronto con altri ceppi, e alla carica batterica adottata.

Nel caso della valutazione dell'efficacia di sostanze naturali a differenza di quanto avviene in campo farmacologico, la divergenza di valori ottenuti può essere legata ad una mancata standardizzazione delle metodiche adottate nei diversi laboratori. Ad esempio, nei due studi citati su *S. e. subsp. e. ser. Tiphy*, in un caso (Andualet, 2013), la valutazione è stata effettuata attraverso diluizioni seriali in brodo, mentre nell'altro caso (Gull et al., 2012), la MIC è stata determinata in piastra in terreno solido secondo il metodo Kirby-Bauer, imbibendo con estratti di aglio, dischetti appositamente costruiti per la sperimentazione. Inoltre, il differente pannello di concentrazioni adottato nei due studi ha portato nella ricerca condotta da Andualet (2013) ad ottenere valori di MIC pari a 6,25 mg/ml, corrispondenti di fatto alla concentrazione minima di aglio valutata nella sperimentazione, mentre Gull et al. (2012), che hanno valutato anche concentrazioni inferiori, hanno invece ottenuto per i batteri testati concentrazioni di MIC variabili tra 0,02 e 0,2 mg/ml. Uno studio più ampio, condotto su 25 ceppi rispettivamente di *E. coli* e *S. aureus* analizzati in concentrazioni batteriche pari a  $10^7$  UFC e mediante diluizioni seriali in brodo, i valori di MIC sono risultati compresi tra 4 mg/ml e 8 mg/ml per entrambi i germi (Yadav et al., 2015).

Altri fattori che possono influenzare la divergenza di valori ottenuti in ricerche diverse sono rappresentati dall'instabilità dell'allicina, principio attivo responsabile dell'attività antimicrobica (Belguith et al., 2010), dalla forma fisica di aglio utilizza-

to, ad esempio fresco o essiccato, e nel caso di utilizzo di un estratto, dalla tipologia e dalla modalità di preparazione. Prove comparative con estratti di aglio, acquoso, alcolico in etanolo, alcolico in metanolo, hanno evidenziato una migliore efficacia dell'estratto acquoso rispetto a quelli alcolici, la cui efficacia risultava tra loro sovrapponibile (Gull et al., 2012), ma anche variabile a seconda del germe testato (Mohsenipour e Hassanshahian, 2015).

L'efficacia antimicrobica delle sostanze naturali potrebbe essere potenziata dalla loro associazione (Bag e Chattopadhyay, 2015). Ad esempio, timo, menta piperita, salvia, pepe nero e aglio, sembrano avere *in vitro* un effetto antimicrobico maggiore nei confronti di *Bacillus subtilis* e *Salmonella* Enteritidis, se testati in sinergismo piuttosto che singolarmente (Al-Turki, 2007), anche se Andualem (2013) non ha evidenziato un reale potenziamento di efficacia dell'aglio se associato al miele.

Prove di campo effettuate su gruppi di tacchini hanno evidenziato un'efficacia di una miscela, composta da acidi organici (acido acetico, formico e propionico), e di aldeide cinnamica, estratto della cannella, aggiunta al mangime in concentrazione pari allo 0,2 %, nel ridurre la concentrazione intestinale di *E. coli* e nel limitare le lesioni indotte da un ceppo 078 antibiotico resistente (Parigi et al., 2017).

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio sono piuttosto incoraggianti. Tuttavia, ulteriori valutazioni su un numero più ampio di ceppi e su un'eventuale associazione dell'aglio con altre sostanze naturali sono auspicabili per poter valutare una eventuale applicabilità di un suo utilizzo in campo. In particolare, l'associazione con altre sostanze naturali potrebbe comportare il vantaggio di limitare i quantitativi di aglio da somministrare agli animali, riducendo l'eventuale rischio di trasmissione di odori sgradevoli al mangime e ai prodotti derivati, uova o carne.

## BIBLIOGRAFIA

1. Al-Turki AI. (2007). Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper, and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*. *J. Food. Agric. Environ.* 5: 92-94.
2. Andualem B. (2013). Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 3: 725-731.
3. Babinska I, Kleczek K, Szarek J and W Makowski. (2012). Modulating effect of propolis and bee pollen on chicken breeding parameters and pathomorphology of liver and kidneys in the course of natural infection with *Salmonella enteritidis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 56: 3-8.
4. Bag A and RR Chattopadhyay. (2015). Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLOSone.* 10: e0131321.
5. Belguith H, Kthiri F, Chati A, Abu Sofah A, Ben Hamida J and A Landoulsi. (2010). Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovars isolates. *Emir. J. Food Agric.* 22: 189-206.
6. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK and U Bandyopadhyay. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *India. Current. Sci.* 82:11.

7. Camarda A, Pugliese N, Bevilacqua A, Circella E, Gradoni L, George D, Spargano O and A Giangaspero. (2018). Efficacy of a novel neem oil formulation (RP03™) to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 32: 290-297.
8. CLSI (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, 7th Ed. - CLSI document M7-A7. Clinical Laboratory Standard Institute; Wayne PA, USA.
9. Fani MM and J Kohanteb. (2012). Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J. Oral. Sci.* 54: 15-21.
10. Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam S, Samra Z and A Athar. (2012). Inhibitory effect of allium satibum and Zingiber officinale extracts on clinically Important drug resistant pathogenic bacteria. *Ann. Clinn. Microbiol. Antimicrob.* 11:8.
11. Ibrahim SA, Dharmavavaram SR, Seo CW and G Shahbazi. (2004). Antimicrobial activity of Bididobacterium Longum (NCFB2259) as influenced by spices. *Internet. J. Food. Safet.* 2: 6-8.
12. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B and N Gupta. (2015). Comparative Evaluation of Antibacterial Efficacy of Six Indian Plant Extracts against *Streptococcus Mutans*. *J. Clin. Diagnostic. Res.* 9: zc50-zc53.
13. Jeong SH, Song W, Bae IK, Kim HS and MJ Park. (2014). Broth microdilution methods using B-lactamase inhibitors for the identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases and metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 44: 49-55.
14. Mohsenipour Z and M Hassanshahian. (2015). The effects of *Allium sativum* Extracts on Biofilm Formation and Activities of Six Pathogenic Bacteria. *Jundishapur. J. Microbiol.* 8: e18971.
15. Parigi M, Massi P, Fiorentini L, Tosi G, Romboli C, Vandi L, Bocciero R and G Fregnani. (2017). Valutazione dell'efficacia di una miscela di acidi organici e fitoterapici nel controllo dell'infezione da *Escherichia coli* nel tacchino. *Atti II° simposio scientifico SIPA. Parma 22 Settembre 2017.*
16. Sampedro M, Artola R, Murature M, Murature D, Ditamo Yand G Roth. (2004). Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *Int Immunopharmacol.* 4: 411-418.
17. Tassou CC, Drosinos EH and GJE Nychas. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4° and 10°C. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 593-600.
18. Yadav S, Trivedi NA and JD Bhatt. (2015). Antimicrobial activity of fresh garlic juice: an in vitro study. *A.Y.U.* 36: 203-206.