

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) E DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA BATTERICIDA (MBC) MEDIANTE METODO DI DILUIZIONE IN BRODO DI CINQUE DIVERSI DISINFETTANTI

EVALUATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) AND MINIMUM BACTERICIDAL CONCENTRATION (MBC) THROUGH BROTH DILUTION METHOD FOR FIVE DIFFERENT DISINFECTANTS

MONTAGNIN C.¹, CAWTHRAW S.², DAVIES R.², SMITH R.P.³, RING I.²,
DE LUCIA A.¹, OSTANELLO F.¹, MARTELLI F.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy; ²Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK; ³Animal and Plant Health Agency (APHA) Epidemiology Department, UK

Parole chiave: disinfettanti, concentrazione minima inibente (MIC), concentrazione minima battericida (MBC)

Keywords: *disinfectant, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)*

RIASSUNTO

La crescente minaccia dell'antimicrobico-resistenza (AMR) comporta una sempre maggior preoccupazione in campo medico, veterinario ed ambientale, portando all'esigenza di elaborare nuove e valide strategie per contrastare in maniera efficace le patologie causate da batteri. In questo contesto, corrette pratiche di biosicurezza unitamente ad un uso responsabile dei disinfettanti hanno guadagnato un ruolo cruciale nella lotta alle infezioni batteriche. In questo studio è stato verificato se le concentrazioni d'uso raccomandate (c.d. *General Order*, GO) di cinque diverse preparazioni commerciali di disinfettanti (Virkon S[®], Interkokast[®], FAM30[®], Virocid[®], Agrochlor[®]) fossero adeguate ad inibire la crescita ed inattivare 15 diversi ceppi batterici, alcuni dei quali veicolanti modelli fenotipici noti di AMR. L'efficacia di ciascun disinfettante è stata espressa come valore di concentrazione minima inibente (MIC) e concentrazione minima battericida (MBC), determinate tramite micrometodo. I risultati indicano che, *in vitro*, il tipo di disinfettante e la sua concentrazione d'uso influenzano l'efficacia inibente e battericida. In particolare, i prodotti a base di QAC/Glutaraldeide e clorocresolo si sono dimostrati i più efficaci e in nessun caso la concentrazione inibente e battericida superava il GO. Risultati differenti sono stati osservati per gli altri composti in funzione della specie batterica testata ed è emersa una scarsa efficacia dei presidi a base di iodio (FAM30[®]) e di perossimonosolfato (Virkon S[®]). È stata inoltre osservata una maggiore resistenza all'azione di diversi presidi disinfettanti da parte di ceppi di *Escheria coli* con diversi profili fenotipici di AMR rispetto agli altri ceppi di *E. coli* sensibili.

ABSTRACT

The growing threat of antimicrobial resistance (AMR) worldwide has led to an increasing concern in the human, veterinary and environmental fields, highlighting the need of new and valid strategies to effectively face diseases caused by bacteria. In this scenario, correct biosecurity practices together with the responsible use of disinfectants have gained a

crucial role in the fight against bacterial infections. This study aimed to verify whether the recommended use concentrations (so-called General Order, GO) of five different commercial disinfectant preparations (Virkon S[®], Interkokast[®], FAM30[®], Virocid[®], Agrichlor[®]) were adequate to inhibit growth and inactivate 15 various bacterial strains, including some which carry known phenotypic patterns of AMR. The effectiveness of each disinfectant was expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values, determined by micromethod. The results indicate that, *in vitro*, the type of disinfectant and its concentration influence the inhibitory and bactericidal efficacy. In particular, the QAC/Glutaraldehyde-based and chlorocresol-based products seemed to be the most effective and the inhibitory and bactericidal concentration never exceed the GO. On the contrary, different results were observed for the other compounds depending on the bacterial species tested and a poor efficiency of the iodine-based (FAM30[®]) and peroximonosulphate-based (Virkon S[®]) products emerged. Interesting was also the finding of a greater resistance to the compounds of the strains of *Escherichia coli* with different phenotypic profiles of AMR compared to other *E. coli* strains sensitive to the same antibiotics.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza (AMR) ha subito un preoccupante incremento. Già nel 1942, pochi anni dopo la scoperta della penicillina, vennero isolati ceppi di *Staphylococcus aureus* penicillino-resistenti (Lowy, 2003). Oggi, dopo mezzo secolo di utilizzo degli antimicrobici (inclusi antibiotici, antivirali ed antiparassitari), il fenomeno della resistenza è diventato un problema globale tanto che il World Health Organization l'ha inserito nella lista delle dieci maggiori minacce alla salute pubblica che l'umanità si trova a dover affrontare (WHO, 2020).

Poiché la resistenza antimicrobica, e in particolare la resistenza agli antibiotici, è diventata una minaccia in tutto il mondo, il Governo del Regno Unito, così come i Governi di numerosi altri Paesi, ha tentato di incentivare l'uso consapevole e responsabile degli antibiotici vietandone l'impiego come promotori della crescita e pubblicando periodicamente linee guida che enfatizzano la necessità di applicare misure più rigorose di controllo e prevenzione delle infezioni (vedi, ad esempio: <https://www.gov.uk/health-and-social-care/antimicrobial-resistance>).

In questo scenario, migliori pratiche di biosicurezza e un uso appropriato dei biocidi hanno acquisito un ruolo fondamentale nella prevenzione e nel controllo delle infezioni, tutelando la salute degli animali e dell'uomo (Bragg et al., 2018). "Biocida" è un termine generico che indica un prodotto chimico in grado di inattivare i microrganismi (McDonnell and Russell, 1999). I disinfettanti sono composti biocidi ampiamente utilizzati nella produzione primaria in quanto fondamentali nell'ambito delle procedure di biosicurezza degli allevamenti intensivi. Un impiego responsabile di questi presidi gioca un ruolo cruciale nelle procedure di pulizia e disinfezione, soprattutto quando viene applicato nell'ambito di una gestione tutto pieno/tutto vuoto. Un uso consapevole dei disinfettanti non può tuttavia prescindere da una profonda conoscenza dei componenti attivi e della loro efficacia contro le diverse popolazioni batteriche (McLaren et al., 2011). Ciò anche in funzione del fatto che è stata osservata una correlazione positiva tra corrette procedure di pulizia e disinfezione e riduzione dell'uso degli antimicrobici (Raasch et al., 2018). Tuttavia, l'impiego crescente di disinfettanti ha determinato la genesi di alcune ipotesi sulla possibilità di sviluppo di una minore sensibilità ai disinfettanti da parte dei batteri e sullo sviluppo di una resistenza crociata agli antibiotici (Maertens et al., 2019; McDonnell and Russell, 1999).

Si ritiene che, se usati correttamente, i biocidi disinfettanti non possano indurre resistenza nei batteri (sia agli antibiotici che ai disinfettanti) in quanto il loro meccanismo d'azione è principalmente aspecifico e multifattoriale. I disinfettanti sono spesso costituiti da miscele di componenti attivi che esplicano la loro tossicità nei confronti di diversi target microbiotici (Maris, 1995; McDonnell and Russell, 1999) e una mutazione all'interno di un singolo gene non sarà in genere in grado di conferire resistenza (Jones et al., 2000). Inoltre, le loro concentrazioni d'uso raccomandate sono in genere molto al di sopra delle concentrazioni minime inibenti (MIC) (Wieland et al., 2017). Tuttavia, i batteri possono sviluppare resistenza nei confronti dei disinfettanti quando le concentrazioni d'uso sono inferiori rispetto a quelle necessarie per ottenere l'effetto batteriostatico o battericida (Nasr et al., 2018), a causa di una diluizione eccessiva, della presenza di materia organica o di biofilm (pulizia insufficiente prima della disinfezione) o della presenza di residui dopo la disinfezione (Amass et al., 2000; Webber et al., 2015).

Diverse prove sperimentali *in vitro* hanno evidenziato una correlazione tra la resistenza agli antibiotici e quella ai disinfettanti (Khan et al., 2016; Templeton et al., 2009), mentre ulteriori studi hanno dimostrato che l'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettanti potrebbe selezionare mutanti con una sensibilità ridotta agli antimicrobici e agli antibiotici a causa di un fenomeno di co-selezione (Kim et al., 2018).

Nel Regno Unito, il *Department for Environmental Food and Rural Affairs* (DEFRA) ha pubblicato un elenco di disinfettanti approvati e idonei all'uso in caso di focolai di specifiche malattie soggette a notifica (Anonimo, 2007), riportando anche le concentrazioni d'uso raccomandate in queste circostanze. Il DEFRA ritiene che questi disinfettanti possano essere utilizzati anche durante le procedure routinarie di pulizia e disinfezione e fornisce la concentrazione d'uso raccomandata (*General Order GO*, espressa come rapporto acqua/disinfettante: <http://disinfectants.defra.gov.uk/>). I test di valutazione dell'efficacia di ciascuna formulazione di disinfettante vengono eseguiti dall'*Animal and Plant Health Agency* (APHA, Addlestone, UK) utilizzando *Salmonella* Enteritidis come organismo di challenge. Il test si considera superato quando, *in vitro*, la concentrazione di *Salmonella* viene ridotta di almeno 5 log.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare se le concentrazioni d'uso raccomandate (GO) per cinque diversi disinfettanti fossero adeguate ad inibire la crescita e ad inattivare 15 ceppi batterici isolati da diversi allevamenti di suini, alcuni dei quali hanno mostrato modelli fenotipici noti di AMR.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici utilizzati

L'eventuale resistenza nei confronti di diversi composti disinfettanti di 16 diversi ceppi batterici è stata valutata determinando la concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC). I ceppi sono stati isolati in diversi allevamenti di suini oggetto di studi precedenti e conservati presso l'APHA.

Sono stati utilizzati 10 ceppi geneticamente distinti di *E. coli*, 4 dei quali presentavano pattern fenotipici diversi e noti di AMR. Il panel di antibioticoresistenza di questi ceppi di *E. coli* AMR è riportato nella Tabella 1.

Gli altri 5 ceppi batterici utilizzati sono stati: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus hirae* e *Salmonella* Enteritidis.

Tabella 1: Profili di antibiotico-resistenza dei quattro ceppi di *Escherichia coli* utilizzati nello studio

Table 1. Antibiotic resistance of the four antimicrobial resistant *Escherichia coli* strains selected for the study

Ceppo	AMP	AZM	CTX	CAZ	CHL	CIP	CST	GEN	MEM	NAL	SFX	TET	TIG	TMP	Fenotipo
4536	64	4	4	2	8	0,02	1	0,5	0,03	4	1024	64	0,5	32	ESBL/ AMPC
4512	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	ESBL
4534	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	AMP C
2229							R								

Note: AMP (ampicillina), AZM (azitromicina), CTX (cefotaxime), CAZ (ceftazidima), CHL (cloramfenicolo), CIP (ciprofloxacina), CST (colistina), GEN (gentamicina), MEM (meropenem), NAL (acido nalixi), SFX (sulfametoxazolo), TET (tetraciclina), TIG (tigeciclina), TMP (trimetoprim); S=sensibile; R=resistente

Disinfettanti utilizzati

Cinque diversi disinfettanti, acquistati da fornitori commerciali, a 8 diverse concentrazioni, sono stati testati contro i 15 ceppi batterici. La scelta dei disinfettanti è stata funzionale ai ceppi batterici oggetto di studio, dal momento che tutti i prodotti testati sono tipicamente destinati ad un uso veterinario, compresa la disinfezione delle strutture e dei mezzi di trasporto.

I disinfettanti commerciali utilizzati sono stati i seguenti: Virkon S[®] (Antec International Limited); Interkokask[®] (Interhygiene GmbH); FAM30[®] (Evans Vanodine International Plc); Virocid[®] (Cid Lines UK); Agrichlor[®] (Hydrachem Limited). Le principali caratteristiche dei disinfettanti e le loro concentrazioni d'uso raccomandate (GO) sono riportate in Tabella 2.

Virkon S[®] è un disinfettante granulare ad ampio spettro, che si attiva a contatto con l'acqua. Si tratta di una miscela stabilizzata di un perossido (potassio perossimonosolfato, KMPS), un tensioattivo (sodio dodecilbenzensolfato), acidi organici (acido malico e solfamidico), un tampone inorganico (sodio esametafosfato) ed un sale (cloruro di sodio). Il principale componente attivo è il KMPS, che ossida le proteine delle cellule batteriche distruggendone la struttura fisica. La sua attività antibatterica è potenziata dal cloruro di sodio, che reagisce con il KMPS e forma un altro potente biocida, l'acido ipocloroso.

Interkokask[®] è un disinfettante a base di clorocresolo. Il cresolo è attivo sia sulla membrana che sul citoplasma batterico: a basse concentrazioni determina la perdita di integrità della membrana mentre a concentrazioni più elevate ha un effetto coagulativo sui costituenti citoplasmatici (McLaren et al., 2011; Russell, 2003).

Due diversi disinfettanti appartengono alla classe degli agenti rilascianti alogeni: FAM30[®] e Agrichlor[®].

FAM30[®] è un disinfettante detergente contenente una miscela di iodofori, acido solforico e acido fosforico. L'attività battericida è determinata dallo iodio molecolare libero (I₂),

stabilizzato in soluzione dagli iodofori (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011). Lo iodio uccide le cellule inibendo la funzione delle proteine e reagendo con nucleotidi e acidi grassi (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011; Punyani et al., 2006).

Agrichlor® è una compressa effervescente di cloro idrosolubile contenente troclosene sodico (NaDCC) come composto attivo. Sciolto in acqua genera una soluzione disinfettante mediante il rilascio della forma attiva del cloro, che si comporta da agente ossidante altamente attivo (McDonnell and Russell, 1999). L'esatto meccanismo d'azione di questo presidio non è stato ancora del tutto chiarito, ma si ritiene che sia riconducibile all'inibizione di alcuni enzimi responsabili di reazioni chiave per la sopravvivenza cellulare, come il ciclo replicativo o la sintesi proteica (Gall et al., 2015).

Virocid® è uno dei disinfettanti più concentrati e possiede un'elevata attività antimicrobica a diluizioni estremamente basse. Consiste in una miscela di 4 diversi gruppi di composti attivi: una combinazione di sali quaternari di ammonio (QAC), glutaraldeide, alcool (isopropanolo) e olio di pino, addizionati di agenti tamponanti e stabilizzanti. I QAC sono tensioattivi cationici che causano un danneggiamento della membrana cellulare (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011) ed effetti anche sul citoplasma batterico, quando impiegati ad elevate concentrazioni (Lambert, 2013), mentre la glutaraldeide è un agente alchilante e determina legami crociati inter- ed intra-proteici.

Ciascun disinfettante è stato diluito in brodo di Mueller Hinton (MHB) fino a 4 volte la concentrazione d'uso raccomandata dal DEFRA. Quando questa concentrazione iniziale non consentiva di determinare la MIC e la MBC, è stata scelta la concentrazione più bassa o quella più alta.

Nella maggior parte dei casi quindi, le concentrazioni testate coprivano un intervallo che andava da una concentrazione inferiore ad una superiore rispetto al valore raccomandato (GO) dal DEFRA. Solo l'Agrichlor è stato diluito in un uguale volume di MHB e acqua e lasciato a -4°C per un'ora prima del test.

Sono state valutate sia la capacità batteriostatica (MIC) che quella battericida (MBC) ed i risultati ottenuti sono stati espressi come rapporto di diluizione.

Determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)

I valori di MIC di ciascuna formulazione di disinfettante nei confronti dei 15 ceppi batterici utilizzati sono stati determinati mediante il metodo di microdiluizione in brodo. Dopo una incubazione *overnight*, le colonie batteriche sono state raccolte con un tampone sterile e sospese in acqua demineralizzata sterile (Thermo Scientific). La sospensione batterica è stata miscelata mediante vortex e regolata utilizzando un nefelometro (Thermo Scientific) per la misurazione automatica della torbidità, fino a ottenere una densità ottica (OD) di 0,5 NTU (unità di torbidità nefelometrica) sulla scala di McFarland.

Venti microlitri di sospensione batterica sono stati quindi diluiti in 11 mL di brodo Mueller-Hinton con TES (Thermo Scientific), ottenendo una concentrazione batterica iniziale di circa 10^5 CFU/mL. Per verificare la correttezza della concentrazione, la sospensione batterica iniziale è stata diluita a 10^{-2} e 10^{-3} e utilizzata per seminare, in duplicato, piastre di BloodAgar o CHROMagar. Dopo 24 ore di incubazione, è stato effettuato il conteggio delle colonie, calcolando la concentrazione batterica in funzione della diluizione utilizzata. Ciascun disinfettante è stato diluito in brodo Mueller-Hinton (MHB) ad una concentrazione pari al doppio di quella iniziale decisa precedentemente per il test. Cinquanta microlitri della miscela MHB-disinfettante sono stati successivamente distribuiti, in triplicato, nella prima fila di una piastra a micrometodo a 96 pozzetti (EUVSEC, Thermo Scientific), già precedentemente caricata, a partire dalla seconda fila, con 50 mL di MHB. Sono state

quindi effettuate delle diluizioni seriali per raddoppio procedendo dalla prima all'ultima fila della piastra. Successivamente, 50 mL di inoculo batterico (contenente circa 10⁵ CFU/mL) sono stati aggiunti alla miscela MHB-disinfettante, ottenendo un volume totale di 100 µL/pozzetto ed un'ulteriore diluizione del disinfettante, che in questo modo raggiungeva, nella prima fila di tre pozzetti, la concentrazione iniziale decisa in precedenza.

La concentrazione iniziale relativa ad alcune combinazioni disinfettante/ceppo batterico è stata in seguito modificata in considerazione dell'impossibilità di assegnare il valore di MIC e di MBC. Le concentrazioni iniziali dei disinfettanti sono riportate in Tabella 2.

Come controllo positivo, 50 µL di ciascuna sospensione batterica sono stati aggiunti a 50 µL di MHB senza disinfettante. Le piastre sono state quindi incubate per 18-24 ore a 37°C. Dopo tale periodo, la torbidità è stata valutata mediante Vizion (Thermo Scientific, Digital MIC Viewing System) e la concentrazione più bassa senza torbidità osservabile è stata stabilita come valore MIC.

Per tutte le combinazioni disinfettante/ceppo batterico sono state eseguite 3 repliche in due diversi momenti (per un totale di 6 valori di MIC) usando una diluizione del disinfettante ed una sospensione batterica di 10⁵ CFU/mL preparate al momento della prova.

Tabella 2: *caratteristiche dei disinfettanti utilizzati e le loro concentrazioni d'uso raccomandate (GO)*

Table 2. *Characteristics of the disinfectants used and their recommended concentrations (GO)*

Disinfettante	Categoria	Principi attivi	General Order (concentrazione d'uso raccomandata)	Concentrazione iniziale
Virkon S	Peroxygen	Potassio perossimonosolfato, Cloruro di sodio	100 ^a	25 400 ^c
Interkokast	Phenol	Clorocresolo	50 ^b	25 400 ^d 100 ^e
FAM30	Halogen-releasing agent (Iodine releasing agent)	Iodio, Acido solforico e Acido fosforico	49 ^b	24,5
Virocid	Quaternary ammonium compound + aldehyde	Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, Didecyl dimethyl ammonium chloride, Glutaraldeide	33 ^b	ND ^f
Agrichlor	Halogen-releasing agent (Chlorine realizing agent)	Troclosene sodico NaDCC	360 ^a	180 500 ^g

^a millilitri di acqua o solvente/grammo di prodotto; ^b millilitri di acqua o solvente/millilitro di prodotto; ^c concentrazione iniziale contro *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*; ^d concentrazione iniziale contro *Staphylococcus aureus*; ^e concentrazione iniziale contro *Enterococcus hirae*; ^f Non definibile; ^g concentrazione iniziale contro *Salmonella* Enteritidis e *E. coli* MSG17 C20

Determinazione della Concentrazione Minima Battericida (MBC)

Per determinare il valore di MBC, un'aliquota di 10 µL è stata prelevata da ciascun pozzetto della piastra utilizzata per il calcolo del valore di MIC e seminata in triplicato su due diverse piastre di Agar Sangue. Una volta asciugate, le piastre sono state incubate per 18-24 ore a 37°C. È stato stabilito che la concentrazione più bassa in cui non veniva osservata alcuna crescita batterica visibile rappresentasse il valore di MBC (riduzione di circa 5 log del numero di CFU).

Per tutte le combinazioni disinfettante/ceppo batterico sono state eseguite 6 repliche in due diversi momenti (per un totale di 12 valori di MBC) usando una diluizione del disinfettante ed una sospensione batterica di 10⁵ CFU/mL preparate al momento della prova.

Analisi statistica

Per ciascuna combinazione disinfettante/ceppo batterico, la MIC è stata calcolata come media geometrica dei valori ottenuti nelle 3 repliche eseguite in due diversi momenti (per un totale di 6 valori). Analogamente, la MBC è **stata calcolata** come media geometrica dei valori ottenuti nelle 6 repliche eseguite in due diversi momenti (per un totale di 6 valori).

In considerazione del fatto che solo l'effetto battericida è di reale utilità nell'ambito della disinfezione, oltre ad una prima categorizzazione in "sensibili" e "resistenti", sulla base del valore di MBC, gli organismi hanno subito un'ulteriore distinzione: i "particolarmente sensibili" e gli "estremamente sensibili", microrganismi per i quali il valore di MBC era inferiore o uguale rispettivamente alla metà e a un terzo del GO ($MBC \leq 2 \times GO$ e $MBC \leq 3 \times GO$).

La stima della normalità della distribuzione campionaria dei valori di MIC e MBC è stata realizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Sulla base dei risultati di questo test, eventuali differenze dei valori di MIC e MBC tra i ceppi di *E. coli* con profili di antibiotico-resistenza e quelli pienamente sensibili, è **stata** realizzata utilizzando il test di U di Mann-Whitney. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata a valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

In nessuna delle combinazioni disinfettante/ceppo batterico la media geometrica dei valori di concentrazione minima inibente (MIC) è risultata superiore alla concentrazione d'uso raccomandata (GO). Tuttavia, per Virkon S, FAM 30 ed Agrichlor, la concentrazione minima battericida (MBC) determinata *in vitro* è risultata superiore al GO per alcuni ceppi batterici (Tabella 3).

Concentrazione minima inibente/Concentrazione minima battericida

Per tutti i disinfettanti commerciali testati, i valori di MIC sono risultati inferiori alla loro concentrazione d'uso raccomandata ($MIC \leq GO$), sia nei valori assoluti che nella media geometrica degli stessi. Tuttavia, per ottenere un'azione battericida sono necessarie dosi maggiori di disinfettante rispetto a quelle che determinano l'effetto batteriostatico. Non tutti i disinfettanti valutati sono stati in grado di inattivare i batteri testati ad una concentrazione inferiore o uguale a quella raccomandata (GO) e sono state necessarie dosi maggiori di prodotto per osservare l'effetto battericida ($MBC > GO$).

Complessivamente, 9 dei 15 ceppi batterici utilizzati hanno evidenziato una resistenza all'azione battericida di almeno un presidio disinfettante, tra questi *P. aeruginosa* e *S. aureus* a un solo disinfettante (rispettivamente Agrichlor e FAM30), *P. vulgaris*, *S. Enteritidis* ed *E. coli* ceppo MSG17C20 a due (Virkon S e FAM30). I 4 ceppi di *E. coli*

con profili noti di AMR hanno evidenziato una resistenza all'azione battericida di Virkon S, FAM30 ed Agrichlor. Al contrario, cinque dei sei ceppi di *E. coli* non AMR e *E. hirae*, sono stati inattivati da tutti i prodotti commerciali e ad una concentrazione inferiore o uguale (come nel caso di Agrichlor) a quella d'uso raccomandata (GO).

Virocid e Interkokast hanno manifestato sia un'azione batteriostatica sia un'azione battericida alla concentrazione definita dal loro GO per tutti i ceppi batterici testati. Nonostante la MIC e la MBC del presidio si attestassero sempre al di sotto del GO, sono state evidenziate differenze tra le diverse specie batteriche e, all'interno della specie *E. coli*, tra i diversi ceppi.

Interkokast (GO: 50), è il secondo presidio per numero di ceppi classificati come "estremamente sensibili" (n=10). Insieme al Virkon S, è stato il disinfettante per cui è stata osservata la maggiore differenza tra i valori di MIC e di MBC. Nel dettaglio, i valori di MIC e di MBC per *E. hirae* (rispettivamente 1:1796 e 1:1131) e per *S. aureus* (rispettivamente 1:5701 e 1:672) sono risultati i più bassi tra tutti i ceppi batterici esaminati. Per *S. aureus* è stata osservata anche la maggior variabilità tra i valori di MIC e quelli di MBC (MIC/MBC=8,5) (Figura 1B). La crescita di *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, con valori di MIC rispettivamente di 1:898 e 1:1425, è stata efficacemente inibita da Interkokast, mentre per la loro inattivazione le concentrazioni sono risultate almeno cinque volte più elevate (MBC, rispettivamente 1:141 e 1:283). I valori di MIC e di MBC dei 7 ceppi di *E. coli* non AMR esposti all'azione di Interkokast sono relativamente simili per tutti i ceppi (1:504<MIC<1:365; 1:400<MBC<1:168), al contrario di quanto è stato osservato per i ceppi di *E. coli* AMR, per i quali il rapporto MIC/MBC variava da 3,2 a 6,7 (Figura 1B). I 4 ceppi di *E. coli* con profili noti di AMR, pur rimanendo "sensibili", hanno manifestato la maggior resistenza all'azione battericida di Interkokast, tanto che la MBC ottenuta per uno di essi (*E. coli* ceppo 4534) era pari alla concentrazione d'uso raccomandata.

Per quanto riguarda Virocid, nonostante l'elevata concentrazione d'uso raccomandata (GO: 33), il prodotto è risultato avere un'azione inibente o battericida anche a diluizioni di oltre 4000 volte superiori. I valori di MIC e MBC più bassi sono stati quelli per *S. aureus* (MIC=MBC 1:135168) e *P. aeruginosa* (MIC=MBC 1:67584). Nessuno dei ceppi batterici esaminati ha però espresso resistenza all'azione battericida di Virocid, tanto che la MBC più elevata è stata 102 volte inferiore al GO (*S. Enteritidis*, MBC 1:3364) e tutti i batteri sono stati definiti "estremamente sensibili" all'inattivazione da parte di questo presidio (MBC≤3×GO). I valori di MIC e di MBC coincidevano (MIC=MBC) per 8 dei 15 ceppi batterici esaminati: *P. vulgaris* (1:33792), *S. aureus* (1:135168), *P. aeruginosa* (1:67584) e cinque dei sei ceppi di *E. coli* non AMR (ceppo 25922, 1:33792; ceppo 4526, 1:23895; ceppo 4527, 1:23895; ceppo 4529, 1:21288; ceppo 4531, 1:16896). Solo per *S. Enteritidis* la differenza tra il valore di MIC e quello di MBC è stata più marcata (rispettivamente 1:22627 e 1:3364; MIC/MBC=6,7) (Figura 1E).

S. aureus e *P. aeruginosa* sono risultati "estremamente sensibili" anche nei confronti di Virkon S (MIC: *S. aureus* 1:6400, *P. aeruginosa* 1:2263; MBC: *S. aureus* 1:6041, *P. aeruginosa* 1:1695). Anche per *E. hirae* l'azione inibente e battericida di Virkon S, utilizzato alla concentrazione d'uso raccomandata (GO 100) è stata efficace (MIC 1:200; MBC 1:159). Il valore di MIC di *P. vulgaris* (1:504) è stato uno dei più bassi osservati per questo disinfettante. Tuttavia, il valore di MBC è risultato superiore rispetto al GO (MBC 1:94) e, per tale motivo, *P. vulgaris* è stato classificato come "resistente" a Virkon S. Anche *S. Enteritidis* (MBC 1:53) ed uno dei quattro *E. coli* non AMR (ceppo MSG17C20: MBC 1:53), venivano inibiti nella crescita da Virkon S, ma si mantenevano vitali a concentrazioni superiori al GO. Inoltre, per i restanti cinque ceppi di *E. coli*

non AMR, il valore di MIC si sovrapponeva a quello di MBC (la stessa concentrazione di disinfettante non solo inibiva la crescita ma inattivava anche i batteri) ed era, per tutti tranne uno (ceppo 4526, MIC=MBC 1:283) pari a 1:200 (Figura 1A). Tuttavia, se una diluizione pari a 1:200 o a 1:283 di Virkon S era in grado di inibire tutti i ceppi di *E. coli* testati e di uccidere i ceppi non AMR, i quattro ceppi di *E. coli* con profili di antibiotico-resistenza hanno invece dimostrato una certa resistenza all'effetto battericida del Virkon S alla sua diluizione consigliata (MBC>GO) (ceppo 4512, MBC 1:26; ceppo 4534, MBC 1:25; ceppo 4536, MBC 1:40; ceppo 2229, MBC 1:26). Inoltre, l'MBC è risultato sempre almeno 5 volte superiore rispetto alla MIC (Figura 1A). In generale, insieme a Interkokast, Virkon S è stato il presidio per il quale la differenza tra i valori di MIC e di MBC era maggiore ma, a differenza di Virkon S, la MBC di Interkokast non superava mai il valore del GO (Figura 1B).

FAM 30 (GO: 49) è stato il disinfettante commerciale per il quale è stata osservata la maggior prevalenza di resistenze all'azione battericida da parte dei ceppi batterici oggetto di studio. Infatti, mentre la MIC è risultata costantemente inferiore al GO per tutti i ceppi batterici esaminati (Figura 1C), 8 dei 15 ceppi sono risultati "resistenti" all'azione battericida (MBC>GO), compreso *S. aureus* (MBC 1:41), che aveva espresso elevate sensibilità nei confronti di tutti gli altri presidi. Gli altri batteri con MBC>GO erano: *P. vulgaris* (MBC 1:35), *S. Enteritidis* (MBC 1:37); *E. coli* ceppo MSG17C20 (MBC 1:29), ed i quattro ceppi di *E. coli* AMR (ceppo 4512, 1:37; ceppo 4534, 1:28; ceppo 4536, 1:29; ceppo 2229, 1:28). Tutti i 6 ceppi di *E. coli* non AMR hanno presentato valori di MIC inferiori al GO; anche l'MBC è risultata, con l'eccezione del ceppo MSG17C20, inferiore al GO. *E. hirae* e *P. aeruginosa* hanno espresso entrambi valori di MBC pari a 1:156, valore che ha permesso di classificarli come "estremamente sensibili", insieme a *E. coli* ceppo 25922 (MBC 1:196). È interessante osservare come, per FAM30, le MIC di *S. aureus* (1:69) e *P. vulgaris* (1:55) sono risultate molto prossime al GO (49). Ciò non è stato osservato per Virkon S e Interkokast, per i quali la MIC non superava mai la metà della concentrazione prevista dal GO. FAM30 è stato il disinfettante per il quale è stato osservato il range più basso dei valori di MIC e di MBC verso le diverse specie batteriche ($1:98 \leq MIC \leq 1:196$; $1:27,5 \leq MBC \leq 1:196$).

Anche per Agrichlor (Figura 1D), il valore di MIC era pari alla concentrazione d'uso raccomandata (GO: 360) per 7 dei 15 ceppi batterici esaminati (tra cui 4 dei 6 ceppi di *E. coli* non AMR, due dei ceppi di *E. coli* AMR e *P. aeruginosa*), mentre per 3 ceppi batterici la diluizione impiegata era di poco inferiore del doppio rispetto a quella prevista dal GO (*E. coli* 4534, 1:509; *E. coli* 2229, 1:404; *E. hirae*, 1:404). Per 5 dei 15 ceppi batterici, l'MBC relativa a Agrichlor superava la concentrazione d'uso consigliata: *P. aeruginosa* (1:240) e quattro ceppi di *E. coli* AMR (ceppi 4512, 4536, 2229 MBC 1:255; ceppo 4534 MBC 1:286). Per quattro ceppi di *E. coli* non AMR (4526; 4527; 4529; 4531) la MIC è risultata uguale alla MBC e coincideva al GO. Anche per *E. hirae* la MBC è risultata uguale al GO. Solo *P. vulgaris* e *S. aureus* potevano essere classificati, rispettivamente, come "estremamente sensibile" (MBC 1:1814) e "particolarmente sensibile" (MBC 1:720) ad Agrichlor. Infine, per questo disinfettante si è osservata inoltre la minor variabilità tra valori di MIC e MBC, tanto che solo per *S. aureus* la MBC è risultata doppia rispetto alla MIC.

In sintesi, 9 dei 15 ceppi batterici esaminati hanno manifestato resistenza all'azione battericida per almeno un disinfettante, mentre *E. hirae* e 5 dei 6 ceppi di *E. coli* non AMR (ceppi 25922, 4526, 4527, 4529, 4531) sono stati inibiti da tutti i disinfettanti. *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono risultati sensibili al maggior numero di disinfettanti e resistenti ad un unico presidio (rispettivamente Agrichlor e FAM30).

Tabella 3: profili di resistenza delle diverse specie batteriche ai disinfettanti
Table 3. Resistance profiles of the bacterial strains against disinfectants

Ceppo batterico	Virkon S	Interkokast	FAM30	Agrichlor	Virocid
<i>Salmonella</i> Enteridits	R	S	R	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo MSG17 C20	R	S	R	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4534 (AMR)	R	S	R	R	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4536 (AMR)	R	S	R	R	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4512 (AMR)	R	S	R	R	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 2229 (AMR)	R	S	R	R	S
<i>Proteus vulgaris</i>	R	S	R	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	S
<i>Enterococcus hirae</i>	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ceppo 13383	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 25922	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4526	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4527	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4529	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i> ceppo 4531	S	S	S	S	S

Note: R = valore di MBC>GO (concentrazione d'uso raccomandata); S = valore di MBC≤GO; (AMR)=antimicrobico-resistente

Confronto delle MIC e MBC tra ceppi di *Escherichia coli* AMR e non AMR

Sono state valutate le eventuali differenze dei valori di MIC e MBC dei 10 ceppi di *E. coli* esaminati e appartenenti a due diverse categorie: 4 ceppi con profili noti di antibiotico-resistenza e 6 ceppi non AMR). Nonostante tutti i ceppi di *E. coli* venissero inibiti da tutti i disinfettanti a concentrazioni inferiori al loro GO (MIC<GO), solo Interkokast e Virocid avevano un'efficace azione battericida (MBC<GO) nei confronti dei ceppi AMR.

Relativamente a Interkokast, tutti i ceppi di *E. coli* presentavano un valore di MIC e MBC inferiore al GO; tuttavia, i valori di MIC e MBC dei ceppi AMR erano significativamente più elevati (rispettivamente, $p=0,014$ e $p<0,001$) rispetto ai ceppi sensibili. Una differenza statisticamente significativa ($p<0,001$) per i soli valori di MBC è stata osservata anche nell'utilizzo di Virkon, FAM30 e Agrichlor, per i quali i ceppi AMR non solo necessitavano di dosi significativamente più elevate per essere inattivati, ma si sono anche dimostrati resistenti (MBC>GO). Nel caso di Virocid, solo il valore di MIC è risultato significativamente più elevato per i ceppi AMR ($p=0,030$).

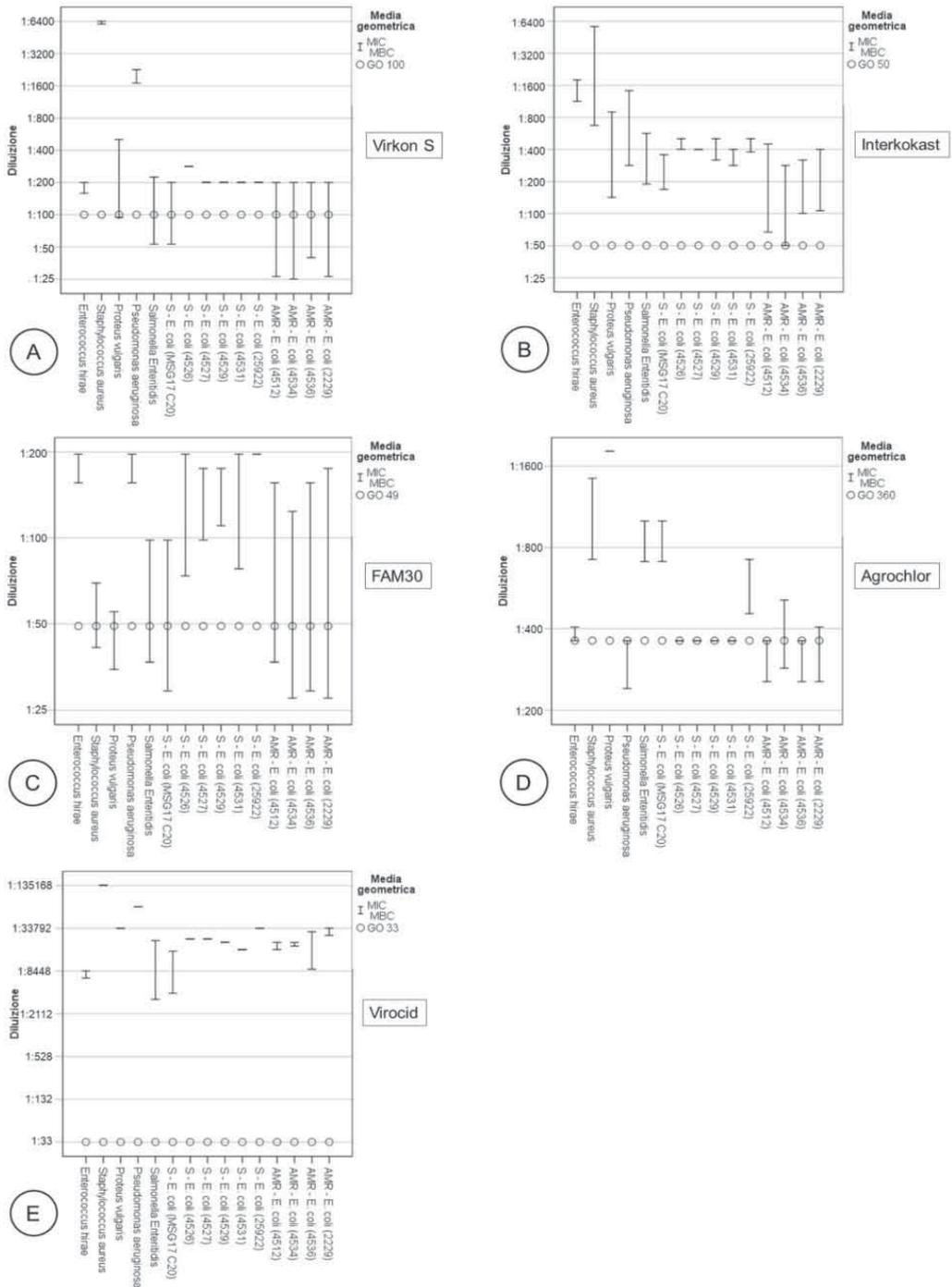


Figura 1: Concentrazione minima inibente (MIC, linea orizzontale superiore) e concentrazione minima battericida (MBC, linea orizzontale inferiore) dei cinque disinfettanti testati
Figure 1. Minimum inhibitory concentration (MIC, upper whisker) and minimum bactericidal concentration (MBC, lower whisker) of the five disinfectants tested

DISCUSSIONE

Le corrette procedure di pulizia e disinfezione delle strutture e delle attrezzature sono una componente essenziale di qualsiasi strategia efficace di controllo degli agenti batterici e virali all'interno degli allevamenti suini. Scegliere correttamente i disinfettanti da utilizzare significa conoscere i microrganismi contaminanti presenti in allevamento e la loro sensibilità ai diversi principi attivi (Jiang et al., 2018).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di verificare *in vitro* l'efficacia di cinque disinfettanti nei confronti di 15 diversi ceppi batterici e di definire non solo se la loro concentrazione d'uso raccomandata (General Order) fosse adeguata, ma anche determinare, sulla base dell'effetto batteriostatico e battericida, la loro efficacia contro alcuni dei batteri di più frequente isolamento negli allevamenti suini. Inoltre, per i ceppi di *E. coli*, è stata valutata l'eventuale associazione tra i le caratteristiche di antibiotico-resistenza e la ridotta sensibilità ai disinfettanti.

In generale, la capacità disinfettante di un qualsiasi antimicrobico non è influenzata solo dal suo meccanismo d'azione, ma anche da altri fattori, tra i quali i più importanti sono la sua concentrazione d'uso, la presenza di materia organica sulle superfici di applicazione e i tempi di contatto (Martelli et al., 2017; McDonnell and Russell, 1999; Ruano et al., 2001).

Uno dei limiti della letteratura disponibile riguardante i disinfettanti è rappresentato dal fatto che molti studi si sono occupati di valutare la loro efficacia nell'ambito dell'industria alimentare oppure in ambiente ospedaliero. Di conseguenza, applicare i risultati di questi studi in un contesto di allevamento risulta difficile e poco significativo (Gradel et al., 2004). Purtroppo, solo pochi Paesi europei, tra cui il Regno Unito, hanno messo a punto metodi ufficiali per la valutazione dei disinfettanti. Tuttavia, si tratta di metodi non armonizzati, e ciò rende difficile il confronto dei risultati.

Con il presente lavoro, si è cercato di incrementare le informazioni disponibili, indagando l'attività di biocidi effettivamente impiegati in ambito veterinario, testando batteri isolati dall'ambiente di diversi allevamenti di suini ed avvalendosi di un metodo che fosse facilmente standardizzabile, quale è la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e battericida (MBC) dei disinfettanti nei confronti di batteri in sospensione in brodocoltura.

Al contrario di quanto accade per gli antibiotici, per i disinfettanti non esistono definizioni di resistenza basate su specifici breakpoints (Chuanchuen et al., 2001; Russell, 2003). Ne consegue che quando si utilizza il termine "resistente" in questo contesto si intende una maggiore tolleranza e una diminuzione della suscettibilità di un determinato microrganismo alla concentrazione di disinfettante in uso e consigliata, al quale era normalmente suscettibile (Kohler et al., 2019; Russell, 2003).

I risultati ottenuti evidenziano come tutti i disinfettanti commerciali esaminati erano in grado di inibire la crescita di tutte le specie batteriche esaminate al valore di concentrazione raccomandato (GO). Tuttavia, nelle procedure di disinfezione, solo l'effetto battericida è di reale interesse (Maris, 1995). In questo studio, l'MBC è stata definita come una riduzione della concentrazione di batteri vitali di almeno 5 logaritmi rispetto alla concentrazione iniziale pre-disinfezione di 10^5 CFU/ml.

Solo Virocid e Interkokast sono risultati efficaci ad una concentrazione pari o inferiore a quella consigliata (GO). Virocid, in particolare, ha espresso sia l'effetto batteriostatico sia l'effetto battericida anche a diluizioni molto elevate, nettamente al di sopra del GO, tanto che il valore di MBC più elevato, osservato nei confronti di *S. Enteritidis*, era comunque 102 volte inferiore alla concentrazione d'uso raccomandata. Interkokast, pur mantenendo la sua attività battericida, per espletarla necessitava di concentrazioni decisamente più alte rispetto a quelle necessarie per inibire buona parte dei batteri, tra cui *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* ed i quattro ceppi di *E. coli* AMR. Inoltre, molto spesso il valore di MIC coincideva con quello di MBC.

I risultati di questo studio confermano quindi l'elevata efficacia nei confronti dei microrganismi

batterici della combinazione QAC/Glutaraldeide ma anche di clorocresolo, già evidenziata in altri lavori sperimentali, anche in presenza di materia organica (Gosling et al., 2016; McLaren et al., 2011).

In contrasto con i due prodotti precedenti, i risultati ottenuti indicano che i disinfettanti meno efficaci *in vitro* sono quelli a base di iodio (FAM30) e a base di potassio perossimonosolfato (Virkon S). L'MBC di FAM30 nei confronti *S. aureus* è risultata superiore alla concentrazione d'uso consigliata, mentre i restanti 7 su 15 ceppi batterici FAM30-resistenti (compresa *S. Enteritidis*) hanno presentato una resistenza associata anche a Virkon S.

Salmonella è un'importante causa di malattia nell'uomo, tanto da essere, in Europa, la seconda zoonosi a trasmissione alimentare (dopo la campylobatteriosi) per numero di casi notificati (EFSA and ECDC, 2021). Parte degli alimenti fonte di infezione è rappresentata da carne suina e la prevalenza negli allevamenti europei da produzione si attesta su valori piuttosto importanti (33,3% di allevamenti da produzione positivi, di cui un 2,2% di positivi per *S. Enteritidis*) (EFSA, 2009). Nonostante la maggior parte dei casi di Salmonellosi umana riconducibili al consumo di carne suina derivi da una contaminazione successiva alla macellazione, rimane importante mantenerne bassa la prevalenza in allevamento, in modo tale da limitare le possibilità di contaminazione (Martelli et al., 2017). Per questi motivi, la resistenza del ceppo di *S. Enteritidis* utilizzato all'azione battericida di FAM30 e di Virkon S genera preoccupazione. Nonostante Payne et al. (2005) avessero attribuito al potassio perossimonosolfato (componente attivo del Virkon S) il più elevato potere disinfettante *in vitro* contro *Salmonella*, numerosi sono gli studi che hanno invece messo in luce la scarsa efficacia di biocidi a meccanismo ossidativo e di quelli a base di iodio, sia *in vitro* che in condizioni che simulano quelle di campo (Gosling et al., 2016; McLaren et al., 2011). Martelli et al. (2017) hanno osservato una contaminazione residua da parte di *Salmonella* quando, per le procedure di pulizia e disinfezione, era stato impiegato un presidio a base di iodio, utilizzato ad una concentrazione anche più elevata rispetto a quella d'uso consigliata.

L'unica resistenza all'inattivazione da parte di *P. aeruginosa* è stata espressa nei confronti di Agrichlor, al quale si sono mostrati resistenti anche i quattro ceppi di *E. coli* AMR. Questo risultato è abbastanza inaspettato, considerando che il NaDCC, componente attivo di Agrichlor, grazie al suo basso peso molecolare riesce ad oltrepassare la membrana fortemente idrofobica di *P. aeruginosa*, responsabile della sua elevata resistenza a molti biocidi (Guerin-Mechin et al., 2004; McDonnell and Russell, 1999). Agrichlor è un disinfettante commerciale, venduto sotto forma di pastiglie effervescenti in acqua. Può essere impiegato sia per la disinfezione delle superfici, ma anche e soprattutto è raccomandato per la disinfezione dell'acqua potabile grazie all'efficacia, alla facilità d'uso e alla stabilità di NaDCC (Fuqua, 2010).

I risultati ottenuti sui restanti batteri testati confermano l'efficacia disinfettante di Agrichlor; tuttavia è importante sottolineare che per *E. hirae* e per la maggioranza dei ceppi sensibili di *E. coli* i valori di MIC e di MBC corrispondevano al GO. Si rende quindi necessario, nell'utilizzo di questo presidio, non diluirlo oltre il valore del GO, dal momento che una concentrazione più bassa potrebbe facilmente scendere al di sotto della soglia di MIC e di MBC.

Sono state messe in evidenza differenze statisticamente significative dei valori di MIC e MBC tra ceppi di *E. coli* antibiotico-sensibili e ceppi con fenotipi noti di antibiotico-resistenza. I ceppi con profili di AMR conosciuta hanno manifestato una ridotta sensibilità ai disinfettanti, la quale si traduceva in un aumento della MIC, della MBC o di entrambe rispetto alle loro controparti antibiotico-sensibili. La possibilità di una cross-resistenza tra antibiotici e disinfettanti è stata già messa in luce precedentemente (Walsh et al., 2011) ed è noto che lo scambio di geni veicolanti resistenza ai disinfettanti e agli antibiotici può avvenire contemporaneamente (co-resistenza) (Gnanadhas et al., 2013; Kim et al., 2018). Nonostante questo, la letteratura a riguardo rimane controversa. Secondo

alcune ricerche, un aumento della MIC di alcuni antibiotici potrebbe essere dovuto ad un'esposizione dei batteri a concentrazioni sub-inibitorie di disinfettanti commerciali (Karatzas et al., 2007; Webber et al., 2015), altri studi invece non hanno rilevato tra questi fenomeni alcuna correlazione (Russell, 2000) o addirittura, in alcuni casi, un'associazione negativa tra l'antimicrobico-resistenza e una ridotta sensibilità ai disinfettanti (Herruzo et al., 2015; Maertens et al., 2019). Tuttavia, il presente studio non aveva l'obiettivo di valutare un'eventuale associazione tra antibiotico-resistenza e riduzione della sensibilità ai disinfettanti. Tuttavia, l'inserimento, tra le popolazioni batteriche testate, anche di ceppi AMR è stato funzionale al verificare l'eventuale presenza di una associazione tra resistenze che sarà approfondita in ricerche successive.

Le metodiche di definizione di MIC e MBC per i batteri in sospensione impiegate in questo studio sono relativamente standardizzabili e permettono di ottenere risultati ripetibili e, per questo motivo, facilmente confrontabili. Tuttavia, i risultati ottenuti devono essere valutati con cautela perché si riferiscono a condizioni *in vitro*. In condizioni di campo sono presenti diversi fattori (es. presenza di materia organica, tipo di materiale delle superfici trattate, temperatura, presenza di biofilm, scarsa pulizia preliminare, scarso tempo di permanenza del disinfettante sulle superfici) che possono influenzare l'efficacia batteriostatica e battericida dei disinfettanti. Inoltre, i batteri in sospensione sono spesso più sensibili all'azione dei disinfettanti rispetto ai batteri presenti su superfici asciutte (Maertens et al., 2019). È stato spesso dimostrato come, in particolare, la presenza di materiale fecale possa inficiare sull'efficacia dei biocidi, anche quando impiegati alle concentrazioni consigliate (McDonnell and Russell, 1999; Ruano et al., 2001; Thomson et al., 2007), tanto che procedure non corrette o non complete di pulizia e di rimozione della materia organica possono annullare l'efficacia dei disinfettanti.

CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato l'esistenza, *in vitro*, di differenze tra disinfettanti commerciali nella capacità di inibire ed inattivare diverse popolazioni batteriche. È stata inoltre evidenziata una minore sensibilità ai disinfettanti nei ceppi di *E. coli* antibiotico-resistenti, rispetto ai ceppi sensibili. I biocidi maggiormente efficaci sono risultati essere Virocid ed Interkokast, mentre il composto a base di iodio (FAM30) e quello a base di perossimonosolfato (Virkon S) si sono dimostrati i meno efficaci. Va quindi sottolineato che l'efficacia delle operazioni di pulizia e disinfezione nell'allevamento suino è fortemente influenzata dalla scelta del disinfettante che deve essere efficace sui ceppi batterici presenti e impiegato a dosi tali da garantirne l'inattivazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Amass, S.F., Vyverberg, B.D., Ragland, D., Dowell, C.A., Anderson, C.D., Stover, J.H., Beaudry, D.J., 2000. Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. . Swine Health and Production 8, 169-173.
2. Anonimo 2007. The Diseases of Animals (Approved Disinfectants) (England) Order 2007.
3. Bragg, R.R., Meyburgh, C.M., Lee, J.Y., Coetzee, M., 2018. Potential Treatment Options in a Post-antibiotic Era. Adv Exp Med Biol 1052, 51-61.
4. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., Schweizer, H.P., 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing *MexCD-OprJ*. Antimicrob Agents Chemother 45, 428-432.

5. EFSA, 2009. Analysis of the Baseline Survey on the Prevalence of Salmonella in Holdings with Breeding Pigs in the EU, 2008 - Part A: Salmonella Prevalence Estimates. 2009. EFSA Journal 7.
6. EFSA, ECDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA J 19, e06406.
7. Fuqua, G.W., 2010. A Comparative Review of Water Disinfection Methods Appropriate for Developing Countries and their Efficacy, Cost-efficiency, and Usability The University of Texas, School of Public Health, Houston, Texas.
8. Gall, A.M., Shisler, J.L., Marinas, B.J., 2015. Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. *Environ Sci Technol* 49, 4584-4590.
9. Gnanadhas, D.P., Marathe, S.A., Chakravorty, D., 2013. Biocides--resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs* 22, 191-206.
10. Gosling, R.J., Breslin, M., Fenner, J., Vaughan, K., West, E., Mawhinney, I., Birch, C., Davies, R.H., 2016. An in-vitro investigation into the efficacy of disinfectants used in the duck industry against Salmonella. *Avian Pathol* 45, 576-581.
11. Gradel, K.O., Sayers, A.R., Davies, R.H., 2004. Surface disinfection tests with Salmonella and a putative indicator bacterium, mimicking worst-case scenarios in poultry houses. *Poult Sci* 83, 1636-1643.
12. Guerin-Mechin, L., Leveau, J.Y., Dubois-Brissonnet, F., 2004. Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbiol Res* 159, 51-57.
13. Herruzo, I., Herruzo, R., Vizcaino, M.J., 2015. Is There A Correlation Between Antibiotic Resistance and Decreased Susceptibility to Biocides in Different Genus of Bacterial Genera? . *Journal of Antibiotics Research* 1, 1-7.
14. Jiang, L., Li, M., Tang, J., Zhao, X., Zhang, J., Zhu, H., Yu, X., Li, Y., Feng, T., Zhang, X., 2018. Effect of Different Disinfectants on Bacterial Aerosol Diversity in Poultry Houses. *Front Microbiol* 9, 2113.
15. Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lee, A.S., 2000. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 28, 184-196.
16. Karatzas, K.A., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J., Humphrey, T.J., 2007. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J Antimicrob Chemother* 60, 947-955.
17. Khan, S., Beattie, T.K., Knapp, C.W., 2016. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere* 152, 132-141.
18. Kim, M., Weigand, M.R., Oh, S., Hatt, J.K., Krishnan, R., Tezel, U., Pavlostathis, S.G., Konstantinidis, K.T., 2018. Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance. *Appl Environ Microbiol* 84.
19. Kohler, A.T., Rodloff, A.C., Labahn, M., Reinhardt, M., Truyen, U., Speck, S., 2019. Evaluation of disinfectant efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods. *Am J Infect Control* 47, 1181-1187.
20. Lambert, P. 2013. Mechanisms of actions of biocides, In: Fraise, A.P., Maillard, J.Y., Sattar, S. (Eds.) *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Blackwell, Oxford, UK, 95-107.
21. Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111, 1265-1273.
22. Maertens, H., De Reu, K., Meyer, E., Van Coillie, E., Dewulf, J., 2019. Limited

- association between disinfectant use and either antibiotic or disinfectant susceptibility of *Escherichia coli* in both poultry and pig husbandry. *BMC Vet Res* 15, 310.
23. Maris, P., 1995. Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech* 14, 47-55.
 24. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F.A., Callaby, R., Rabie, A., Gosling, R.J., Fordon, S., Crocker, G., Davies, R.H., Smith, R.P., 2017. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS One* 12, e0178897.
 25. McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 147-179.
 26. McLaren, I., Wales, A., Breslin, M., Davies, R., 2011. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of *Salmonella* farm contamination. *Avian Pathol* 40, 33-42.
 27. Nasr, A.M., Mostafa, M.S., Arnaout, H.H., Elshimy, A.A.A., 2018. The effect of exposure to sub-inhibitory concentrations of hypochlorite and quaternary ammonium compounds on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control* 46, e57-e63.
 28. Punyani, S., Narayana, P., Singh, H., Vasudevan, P., 2006. Iodine based water disinfection: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 65, 116-120.
 29. Raasch, S., Postma, M., Dewulf, J., Stark, K.D.C., Grosse Beilage, E., 2018. Association between antimicrobial usage, biosecurity measures as well as farm performance in German farrow-to-finish farms. *Porcine Health Manag* 4, 30.
 30. Ruano, M., El-Attrache, J., Villegas, P., 2001. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Dis* 45, 972-977.
 31. Russell, A.D., 2000. Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol* 52, 227-233.
 32. Russell, A.D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 3, 794-803.
 33. Templeton, M.R., Oddy, F., Leung, W., Rogers, M., 2009. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Civil Engineering* 36.
 34. Thomson, J.R., Bell, N.A., Rafferty, M., 2007. Efficacy of some disinfectant compounds against porcine bacterial pathogens. *The Pig Journal* 60, 15-25.
 35. Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 11, 355-362.
 36. Webber, M.A., Whitehead, R.N., Mount, M., Loman, N.J., Pallen, M.J., Piddock, L.J., 2015. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *J Antimicrob Chemother* 70, 2241-2248.
 37. WHO 2020. Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Consultato il 10 marzo 2021.
 38. Wieland, N., Boss, J., Lettmann, S., Fritz, B., Schwaiger, K., Bauer, J., Holzel, C.S., 2017. Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from poultry-ESBL/AmpC-phenotype of *E. coli* is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. *J Appl Microbiol* 122, 1508-1517.