

RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI SALMONELLA TYPHIMURIUM E DELLA SUA VARIANTE MONOFASICA ISOLATI DA SUINI IN ACCRESCIMENTO

D'INCAU M.^[1], GRASSI A.^[1], GIOVANNINI S.^[1], SALOGNI C.^[1], ZANONI M.^[1],
RUGGERI J.^[1], PASQUALI P.^[2], ALBORALI G.L.^[1]

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna ~ Brescia
~ Italy, ^[2]Istituto Superiore di Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: Salmonella typhimurium, zoonosis, antimicrobial resistance

Riassunto

Da indagini batteriologiche, eseguite nel periodo 2012 – 2014, su campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino sono stati isolati 245 ceppi di Salmonella typhimurium di cui 202 appartenenti alla sua variante monofasica. Per tutti i ceppi è stata valutata la sensibilità in vitro agli antimicrobici con il metodo Kirby – Bauer. I risultati ottenuti mettono in evidenza il tipo fondamentale di multiresistenza già riscontrato in precedenti lavori (amoxicillina, tetraciclina, streptomycina e sulfonamidi). Inoltre, il 24,49% degli isolati è risultato resistente a 10 o più molecole contemporaneamente.

Abstract

245 strains of Salmonella typhimurium (202 belonging to its monophasic variant) were isolated in the period 2012 - 2014, from fecal samples, viscera, lymph nodes and pig carcasses. All strains were tested in vitro for antimicrobial susceptibility by Kirby – Bauer method. The results highlight the fundamental type of multidrug resistance showed in previous works (amoxicillin, tetracycline, streptomycin, sulfonamides). Furthermore, 24,49% of the isolates were resistant to 10 or more antibiotics.

INTRODUZIONE:

Le infezioni da Salmonella rappresentano in tutti i paesi industrializzati una delle principali zoonosi a trasmissione alimentare (7). Nel suino l'isolamento di questo patogeno non è infrequente e, spesso, il suo riscontro avviene in assenza di un rilievo clinico.

Accanto al monitoraggio dei sierotipi circolanti assume una notevole importanza il monitoraggio dell'antibiotico – resistenza, dati gli attuali orientamenti sull'utilizzo mirato degli antimicrobici volto a una riduzione del loro impiego. La presenza, la diffusione e l'emergenza di cloni batterici multiresistenti, che costituiscono uno dei problemi di sanità pubblica emergenti e di maggiore interesse, sono stati riportati con sempre maggiore frequenza nei decenni recenti: tra questi vanno annoverati i fagotipi DT 193 e DT 104 di Salmonella typhimurium (ST), presenti fino dagli anni 1980, e, in anni recenti, la variante monofasica di Salmonella typhimurium (STVM). Quest'ultima è stata isolata con sempre maggiore frequenza a partire dai primi anni 2000 (5) e, nell'ambito della specie suina, costituisce il sierotipo con la maggiore prevalenza.

Scopo di questo lavoro è quello di fornire una panoramica sull'andamento della sensibilità in vitro di alcuni dei principali antibiotici utilizzati nell'allevamento suino e nel trattamento delle infezioni da Enterobacteriaceae con particolare riguardo a Salmonella typhimurium e alla sua variante monofasica.

MATERIALI E METODI:

Per valutare l'antibiotico resistenza di ceppi di *Salmonella typhimurium* (4,[5],12:i:1,2) e della sua variante monofasica (4,[5],12:i:-), nel periodo compreso fra il 2012 ed il 2014, i campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino in accrescimento, pervenuti presso la Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER), per indagini batteriologiche ed anatomopatologiche, sono stati analizzati per ricerca di *Salmonella* spp. Nel periodo indicato sono stati isolati n. 43 ceppi di ST e n. 202 ceppi di STVM. L'isolamento è stato effettuato con la metodica contemplata dalla norma ISO 6579 (1), prevista nell'ambito dell'attuazione dei piani di monitoraggio e controllo di *Salmonella* a livello di produzioni primarie. Questa metodica prevede i seguenti passaggi: arricchimento in acqua peptonata tamponata, pre – arricchimento selettivo in terreno semisolido e isolamento selettivo – differenziale in terreno solido in piastra.

L'identificazione di specie si è basata sulla valutazione delle caratteristiche colturali su terreno in piastra seguite da quelle su terreno differenziale su slant (Triple Sugar Iron agar, TSI), sulle caratteristiche biochimiche e sulla conferma finale mediante agglutinazione con antisiero anti – *Salmonella* poliagglutinante. La caratterizzazione sierologica completa di *Salmonella* è stata eseguita mediante agglutinazione rapida su vetrino per la determinazione degli antigeni somatici, mentre per la determinazione degli antigeni flagellari è stato applicato il metodo di agglutinazione lenta a caldo secondo la tecnica Spicer (12), modificata da Edwards (6) e Morris et al. (11). Gli esiti delle determinazioni degli antigeni sono stati poi impiegati per la caratterizzazione sierologica definitiva per la quale è stato utilizzato lo schema di Kauffmann – White – Le Minor (8).

I ceppi identificati come ST e come STVM sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità in vitro nei confronti di 24 antimicrobici che comprendono i principali antibatterici impiegati nell'allevamento suino e quelli previsti per il trattamento delle infezioni sostenute da Enterobacteriaceae.

Il test di sensibilità agli antibatterici è stato eseguito con la metodica Kirby Bauer (2, 3). La lettura degli aloni di inibizione è stata fatta in doppio con il sistema automatizzato Sirscan 2000 e con la lettura manuale.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1 e sono espressi come percentuale di ceppi risultati sensibili, intermedi e resistenti al test in vitro eseguito utilizzando i 24 antimicrobici selezionati nel periodo 2012 – 2014.

Tabella 1

	S	I	R
Amoxicillina	5,71%	0,41%	93,88%
Amoxicillina + A. clavulanico	74,46%	16,88%	8,66%
Apramicina	85,39%	1,37%	13,24%
Cefalotina	60,00%	24,08%	15,92%
Cefquinome	90,18%	5,36%	4,46%
Ceftiofur	65,57%	29,10%	5,33%
Colistina	91,43%	4,90%	3,67%
Danofloxacin	83,27%	15,51%	1,22%
Doxiciclina	4,22%	2,95%	92,83%
Enrofloxacin	71,49%	12,81%	15,70%
Gentamicina	70,61%	7,76%	21,63%
Kanamicina	48,98%	29,80%	21,22%
Marbofloxacin	93,42%	3,70%	2,88%
Neomicina	1,22%	51,84%	46,94%
Sulfadiazina	2,04%	0,41%	97,55%
Tetraciclina	2,45%	2,45%	95,10%
Sulfonamidi + Trimethoprim	77,55%	1,22%	21,22%
Acido Nalidixico	52,50%	28,75%	18,75%
Amikacina	67,76%	16,73%	15,51%
Cefazolina	60,82%	26,53%	12,65%
Cefotaxime	86,31%	7,88%	5,81%
Cloramfenicolo	53,28%	4,51%	42,21%
Spectinomomicina	49,38%	23,46%	27,16%
Streptomomicina	4,08%	4,49%	91,43%

Dal riepilogo dei risultati è evidenziabile un'elevata percentuale di ceppi resistenti (oltre 90% dei ceppi) a amoxicillina, doxiciclina, tetraciclina, streptomomicina e sulfonamidi. Altre molecole in cui si riscontra un'elevata percentuale di ceppi resistenti sono individuabili in neomicina (46,94% dei ceppi) e cloramfenicolo (42,21% dei ceppi); per gli altri antibiotici testati si rilevano percentuali di ceppi resistenti inferiori al 30%. Nella tabella 2 sono indicati i conteggi dei ceppi di ST e STVM in relazione al numero di resistenze riscontrate contemporaneamente in un singolo ceppo (multiresistenza). In particolare, esaminando le singole classi di multiresistenza, si rileva che quelle maggiormente rappresentate sono quelle con 5 (43 ceppi), 6 (47 ceppi) e 7 (32 ceppi) resistenze includenti complessivamente circa la metà dei ceppi testati (n = 122). In particolare i pattern più rappresentati sono quello comprendente amoxicillina, doxiciclina, tetraciclina, streptomomicina e sulfonamidi (32 ceppi di cui 25 appartenenti alla variante monofasica) e quello comprendente gli stessi cinque antibiotici a cui si aggiunge la neomicina (18 ceppi, tutti appartenenti alla variante monofasica).

Tabella 2

N. resistenze	Conteggio ceppi		
	STVM	ST	TOTALE
0		1	1
2	2	1	3
3		1	1
4	10		10
5	35	8	43
6	42	5	47
7	31	1	32
8	20	5	25
9	20	3	23
10	13	7	20
11	9	7	16
12	8		8
13	4	1	5
14	2	1	3
15	3	1	4
16	2	1	3
18	1		1
	202	43	245

I risultati esposti rivelano e confermano la netta prevalenza di STVM su ST: questo dato concorda con quello di altri studi (9) che riconoscono nel suino una delle principali fonti di questa sierovariante.

I risultati relativi all'antibiotico – resistenza mettono in evidenza il tipo fondamentale di multiresistenza: amoxicillina, tetraciclina, streptomina e sulfonamidi; questo pattern rappresenta il tratto fondamentale e caratteristico della resistenza agli antimicrobici dei sierotipi oggetto dell'indagine, come già evidenziato in numerosi studi sull'argomento (4, 10). Su questo profilo di base si inseriscono altre resistenze che conferiscono al ceppo caratteristiche di resistenza estesa: nel nostro caso un significativo numero di ceppi (60 in totale, corrispondente al 24,49% degli isolati) è risultato resistente a 10 o più molecole contemporaneamente. In particolare elevate percentuali di resistenza si registrano a carico di cloramfenicolo e neomicina.

Rispetto a un precedente lavoro (13) vi è la conferma del profilo di base di resistenza così come vi è la riprova di un'elevata percentuale di ceppi resistenti alla doxiciclina e un significativo apporto dei ceppi resistenti al cloramfenicolo. Da rilevare l'incremento dei ceppi resistenti a neomicina che annovera inoltre un'elevata percentuale di ceppi a sensibilità intermedia.

Alla luce di quanto esposto va ribadita la necessità di utilizzare un protocollo diagnostico che preveda l'esecuzione del test di sensibilità in vitro sul ceppo isolato in corso di patologia soprattutto in episodi ad eziologia multipla. Il dato di laboratorio ha, come sempre, un valore indicativo ai fini di un corretto approccio terapeutico. Inoltre va sottolineata l'importanza del

fatto che il veterinario pratico sia a conoscenza dei dati di laboratorio (visti quali elementi indicativi dell'evoluzione dell'antibiotico – resistenza) in modo da poter procedere con tempestività alla scelta dell'impiego di antibiotici o dei prodotti alternativi ad azione antimicrobica per il controllo di ST e STVM nel suino in accrescimento.

BIBLIOGRAFIA:

1. ISO 6579:2002/Amd.1:2007 (2007) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage
2. NCCLS M2-A8 (2003) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard, 8th ed. NCCLS, Wayne
3. NCCLS M100-S14 (2004) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14th informational supplement. NCCLS, Wayne
4. Argüello H., Sørensen G., Carvajal A., Baggesen D.L., Rubio P., Pedersen K. (2014) Characterization of the Emerging *Salmonella* 4,[5],12:i:- in Danish Animal Production. *Foodborne Pathog Dis* 11: 366-372
5. Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. (2009) Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis* 6:711-717;
6. Edwards P.R. (1962) Serologic examination of *Salmonella* cultures for epidemiologic purposes. Public Health Service Publication. National Communicable Disease Center, Atlanta
7. EFSA (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J* 11: 3129
8. Grimont P.A.D., Weill, F.-X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars (9th ed.) WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris
9. Hopkins K.L., de Pinna E., Wain J. (2012) Prevalence of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in England and Wales, 2010. *Euro Surveill* 17: pii = 20275
10. Lucarelli C., Dionisi A.M., Torpdahl M., Villa L., Graziani C., Hopkins K., Threlfall J., Caprioli A., Luzzi I. (2010) Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 48: 2103-2109
11. Morris G.K., Steele C.D., Wells, J.G. (1972) Evaluation of plastic multi-well plates for serological screening of *Salmonella* cultures with Spicer-Edwards pooled antisera. *Appl Microbiol* 24: 846-848
12. Spicer C.C.(1956) A quick method of identifying *Salmonella* H antigens. *J Clin Pathol* 9:378-379
13. Zanoni M., Guadagnini G., Gradassi M., Salogni C., D'Incau M., Alborali L. (2008) Indagine preliminare sull'antibiotico resistenza in ceppi di *Salmonella typhimurium* isolati da suino nel periodo 2005-2007. *Atti Soc Ital Patol Allev Suini, XXXIV Meeting Annuale*: 315-318