

# PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. ISOLATI NELLA FILIERA SUINA

## ANTIBIOTIC- RESISTANCE PROFILES OF *SALMONELLA* SPP. STRAINS ISOLATED FROM THE SWINE CHAIN

TORREGGIANI C., PROF. BRINDANI F.<sup>1</sup>, DOTT.SSA BACCI C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Università degli studi di Parma, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie*

**Parole Chiave:** antibiotico-resistenza, Salmonella, suini

**Key words:** antibiotic-resistance, Salmonella, swine

### RIASSUNTO

In questo lavoro si è indagato sulla presenza di *Salmonella* spp. nel suino e sulle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati. L'obiettivo è stato quello di fornire ulteriori dati in merito ai profili fenotipici e genotipici di resistenza in ceppi di *Salmonella* spp. isolati da suini allevati e macellati nella regione Lombardia in provincia di Cremona.

La maggiore preoccupazione riguardo al fenomeno dell'antibiotico-resistenza è rivolta agli agenti appartenenti alle categorie dei fluorochinoloni e cefalosporine, sostanze presenti nella lista critica elaborata dall'OMS. In questo studio *Salmonella* spp. è stata rilevata nel 10% dei campioni ottenuti dalle carcasse suine. L'analisi del profilo fenotipico dei ceppi isolati è preoccupante: 4 antibiotici, corrispondenti al 28,6% degli agenti testati, sono risultati inefficaci. Gli antibiogrammi eseguiti per la ricerca di resistenze verso le cefalosporine di III e IV generazione su isolati di *Salmonella* spp. non hanno mostrato nessuna resistenza e i ceppi non sono risultati produttori di ESβL. Anche le prove biomolecolari condotte mediante l'uso della RT-PCR non hanno evidenziato la presenza del gene CTX-M in alcun isolato di Salmonella. Oggi la resistenza batterica ad antibiotici rappresenta un problema globale che va affrontato in una logica collaborativa ispirata al concetto di "One-Health", ovvero la salute umana e/o animale va tutelata senza settorialismi e senza prescindere dal contesto ambientale.

### ABSTRACT

In this work we investigated the presence of *Salmonella* spp. in the pig and on the antibiotic-resistance characteristics of the isolates. The aim was to provide further data on phenotypic and genotypic resistance profiles in *Salmonella* spp. isolated from pigs reared and slaughtered in the Lombardy region in the province of Cremona.

The main concern regarding the antibiotic-resistance phenomenon is directed to the agents belonging to the categories like fluoroquinolones and cephalosporins, substances present in the critical list elaborated by the WHO. In this study *Salmonella* spp. was detected in 10% of samples obtained from pig carcasses. The analysis of the phenotypic profile of the isolated strains is serious: 4 antibiotics, corresponding to 28.6% of the tested agents, were ineffective. The antibiograms performed for the detection of resistance to cephalosporins of III and IV generation on *Salmonella* spp. isolates showed no resistance and the strains were not ESβL producers. Biomolecular tests conducted using RT-PCR also did not show the presence of the CTX-M gene in any *Salmonella* isolate. Today, bacterial resistance to antibiotics represents a global problem that must be tackled in a collaborative logic inspired by the concept of "One-Health", that is to say human and animal health must be protected without sectarianism and without regard to the environmental context.

## INTRODUZIONE

*Salmonella* spp. è uno dei patogeni più largamente coinvolti nelle gastroenteriti umane di origine alimentare: le carni suine e i prodotti derivati sono responsabili della maggior parte delle malattie trasmesse da alimenti a livello mondiale. I suini sono considerati serbatoio di *Salmonella* e possono eliminare il batterio nell'ambiente attraverso le feci, anche in assenza di sintomi; questo fenomeno, da un lato porta ad una incontrollata dispersione del microrganismo negli allevamenti, dall'altro è alla base delle contaminazioni delle carcasse e quindi degli alimenti poiché è possibile una cross contaminazione dovuta alla presenza di animali eliminatori avviati alla catena di macellazione in quanto asintomatici. (D.M. Bianchi et al., 2007). Dai report annuali diffusi dal Sistema Entervet emerge che in generale i suini sono la specie più coinvolta negli isolamenti di *Salmonella* spp. (28,41% nel 2005) seguiti dai polli (25,65% nel 2005). I sierotipi identificati tra gli isolati da suini sono S. Typhimurium (29%), S. Derby (23%) e il sierotipo monofasico 4,5,12:i:- (13%); inoltre, a confermare che la contaminazione degli alimenti ha origine in allevamento gli stessi sierotipi, seppur con piccole variazioni percentuali, sono i più isolati da matrici alimentari di origine suina. L'antibiotico-resistenza è attualmente considerata uno dei più gravi problemi di sanità pubblica a livello mondiale: il trend rilevato è di un continuo aumento dell'antibiotico-resistenza in oltre un terzo dei Paesi europei negli ultimi anni, e un aumento delle percentuali di ceppi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL). Viene segnalata inoltre, un'alta percentuale di antibiotico-resistenza tra i batteri Gram negativi, sottolineando la continua perdita di efficacia delle terapie e la necessità di una strategia condivisa su più fronti. La comunità scientifica internazionale è concorde nel sostenere la necessità di misure che portino ad uso corretto e razionale degli antimicrobici, ritenendo l'uso inappropriato degli stessi, un motivo di accelerazione del fenomeno.

In questo lavoro si è indagato sulla presenza di *Salmonella* spp. nel suino, animale che comunemente vive a stretto contatto con l'uomo e sulle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati. Nell'ambito delle scienze mediche, un tema di cruciale importanza è quello del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, questo lavoro si inserisce in questo ambito, con l'intento di fornire ulteriori dati in merito ai profili fenotipici e genotipi di resistenza in ceppi di *Salmonella* spp. isolati da suini allevati e macellati nella regione Lombardia in provincia di Cremona.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo tra agosto 2016 e febbraio 2017 sono stati prelevati 100 campioni da carcasse di suino provenienti da allevamenti intensivi della provincia di Cremona. L'attività di campionamento è stata condotta durante il periodo di tirocinio, svolto presso il laboratorio di Microbiologia dell'U.O. di Ispezione degli Alimenti di origine animale del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie.

Per il metodo di campionamento (non distruttivo) si è fatto riferimento alla norma UNI EN ISO 17604:2015, come previsto dal Reg. CE 2073 del 2005 e smi, Allegato I Cap. 3. Le indicazioni relative ai siti di prelievo, alla conservazione e al trasporto dei campioni sono quelle previste dalle norme cogenti, come riportato in seguito. Per il campionamento sono state utilizzate spugne abrasive imbevute con 10 ml di soluzione sterile e contenute in appositi sacchetti (SaniSponge, VWR Chemicals, Italia). Sono state campionate, in ogni sessione di campionamento, 5 carcasse prima del raffreddamento, nelle parti della carcassa previste dal Regolamento CE 2073 del 2005 e smi (lombo, guancia, faccia mediale della coscia e pancetta). La superficie da campionare è stata identificata da un delimitatore monouso.

La spugna sterile è stata passata più volte in senso orizzontale e in senso verticale sulla superficie delimitata, per un totale di 400 cm<sup>2</sup>. Al termine del prelievo la spugnetta è stata riposta nel proprio sacchetto ed è stato aggiunto il terreno di pre-arricchimento specifico per la ricerca di *Salmonella* spp. (Buffered Peptone Water BPW, Biolife Italiana, Italia), fino a un volume totale di 25 ml. Il sacchetto è stato chiuso ermeticamente, identificato e

inviato al laboratorio a una temperatura di trasporto di +8 °C +/- 2°C.

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata condotta applicando la procedura prevista dalla norma UNI ISO 6579:2008, in relazione ai campioni raccolti dalle carcasse.

Fase di pre-aricchimento: In ciascun sacchetto contenente le spugne utilizzate per il campionamento delle carcasse, sono stati aggiunti 225 ml di BPW, in modo da ottenere una diluizione del campione di 1:10. In seguito i sacchetti sono stati incubati in un termostato a 37°C per circa 18 h +/- 2 h.

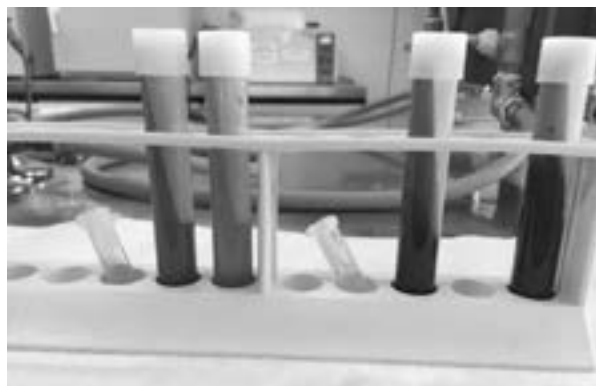
Fase di arricchimento: Dai sacchetti, è stato prelevato 0,1 ml di brodocoltura (mediante l'uso di un pipettatore sierologico con puntale sterile) ed è stato trasferito in una provetta contenente 10 ml del brodo di arricchimento Rappaport-Vassiliadis (RVB; Rappaport Vassiliadis Broth, Biolife Italiana, Italia), successivamente incubata a 41,5° +/- 1°C per 24 h.

Sempre mediante pipettatore sierologico con puntale sterile, è stato prelevato 1 ml di brodocoltura dai sacchetti ed è stato trasferito in provette contenenti 10 ml del brodo di arricchimento Muller-Kauffman Tetrathionate (MKTT, Biolife Italiana, Italia) ed in inseguito incubata a 37 °C per 24 h.

Semina in piastra con terreno selettivo: Dai due brodi di arricchimento (RVB e MKTT) sono stati prelevati 10 µl, mediante un'ansa sterile monouso, e sono stati seminati su piastre con terreni selettivi per *Salmonella* spp. E' prevista la semina di ogni provetta di RV e di MKTT su due terreni selettivi. Il primo terreno utilizzato previsto dalla norma UNI ISO 6579:2008 è stato lo Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar) (Xld Agar Iso Formulation, Biolife Italiana, Italia). Il controllo di produttività è stato fatto mediante il ceppo ATCC 13076 (*S. Enteritidis*).

Il secondo terreno selettivo da noi scelto è stato il Chromogenic Salmonella Agar (CSA) (Chromogenic Salmonella Agar, Biolife Italiana, Italia). Tutte le piastre sono state incubate in termostato a 37 °C overnight. Il controllo di produttività è stato fatto mediante il ceppo ATCC 14028 (*S. Typhimurium*).

Dopo il passaggio in termostato, tutte le piastre sono state valutate per evidenziare la presenza di colonie con caratteristiche tipiche per *Salmonella* spp. e ben isolate. Le colonie sospette e isolate sono state sottoposte a prove di conferma biochimica mediante semina su terreni specifici, come previsto dalla norma ISO 6579:2008: Urea Agar Base, Lysine Iron Agar e Triple Sugar Iron Agar. I terreni sono stati incubati a 37°C overnight.



**Figura 1:** Provette contenenti i terreni utilizzati per le prove biochimiche per la ricerca di *Salmonella* spp., a sinistra non seminati e a destra come appaiono dopo la semina e l'incubazione overnight: Urea Agar Base (o Urea di Christensen), Lysine Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar (foto dell'autore).

**Figure 1:** Tubes containing the media used for biochemical tests for *Salmonella* spp., Left uncultivated and right as they appear after sowing and overnight incubation: Urea Agar Base (or Christensen's Urea), Lysine Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar (photo of the author).

Dopo l'incubazione, le prove biochimiche di ciascuna colonia sono state valutate in base alle variazioni delle caratteristiche dei terreni utilizzati in caso di sospetta presenza di *Salmonella* spp. Per confermare ulteriormente l'appartenenza di una colonia al genere *Salmonella* viene eseguita una prova con siero polivalente anti-antigene O.

I campioni, positivi per *Salmonella* alle prove precedentemente descritte, sono stati seminati su piastre di terreno nutritivo di base, il Tryptic Soy Agar (TSA) (Tryptic Soy Agar, Biolife Italiana, Italia), e incubate a 37° C per 24 ore. In seguito è stata prelevata una colonia isolata ed è stata sottoposta a ulteriore conferma mediante microgallerie biochimiche, specifiche per *Enterobacteriaceae*, seguendo le istruzioni della ditta produttrice (API 20E®, bioMérieux S.p.A., Francia).

Le colonie identificate come *Salmonella* spp. sono state sottoposte alla ricerca di resistenze antibiotiche verso cefalosporine di III e IV generazione. Il metodo che è stato utilizzato, previsto dalla Commissione Europea per i test di sensibilità antibiotica (EUCAST), è l'agar diffusione con dischetto o test di Kirby Bauer. abbiamo depositato i dischi di antibiotico (Cefotaxime 30 µg; Cefotaxime 30µg+ Clavulanato 10 µg; Ceftazidime 30 µg; Ceftazidime 30g + Clavulanato 10 µg; Cefepime 30 µg; Cefepime 30 µg + Clavulanato 10 µg) premendoli sulla superficie dell'agar. Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera aerobica per 18 +/- 2h. Alle piastre è stato aggiunto un dischetto di Amoxicillina associata a clavulanato (20 µg+ 10 µg). I campioni identificati come *Salmonella* spp. sono stati sottoposti a prove di resistenze antibiotiche mediante valutazione della concentrazione minima inibente (MIC). Per l'esecuzione sono state utilizzate piastre con micropozzetti precaricati con antibiotici prediluiti. Gli antibiotici sono stati scelti sulla base dei pannelli proposti da EUCAST (Piastrine SENSITITRE, Trek Diagnostic System). Gli antibiotici testati sono stati: sulfametossazolo, trimethoprim, ciprofloxacina, tetraciclina, meropenem, azitromicina, acido nalidixico, cefotaxime, cloramfenicolo, tigeciclina, ceftazidime, colistina, ampicillina, gentamicina. Per validare ogni test sono stati utilizzati controlli negativi e positivi nei pozzetti corrispondenti.

Indagini biomolecolari: Il DNA è stato estratto come descritto da (Lakshmi, 2012). Il DNA estratto è stato sottoposto a Real Time PCR (RTq-PCR) usando specifici primer, descritti da Roschanski N. nel 2014.

## RISULTATI

La presenza di *Salmonella* spp. è stata rilevata in 10 campioni su 100 (10%), ottenuti sia dalle carcasse suine. Gli antibiogrammi eseguiti sulle colonie isolate di *Salmonella* spp. per la ricerca di resistenze di cefalosporine di III e IV generazione, mediante produzione di beta-lattamasi a spettro esteso non hanno evidenziato la presenza di resistenze verso gli antibiotici testati.

I ceppi identificati come *Salmonella* spp. sono stati sottoposti a prove di resistenze antibiotiche mediante valutazione della concentrazione minima inibente (MIC). Il test ha mostrato resistenze variabili nei confronti degli antibiotici testati.

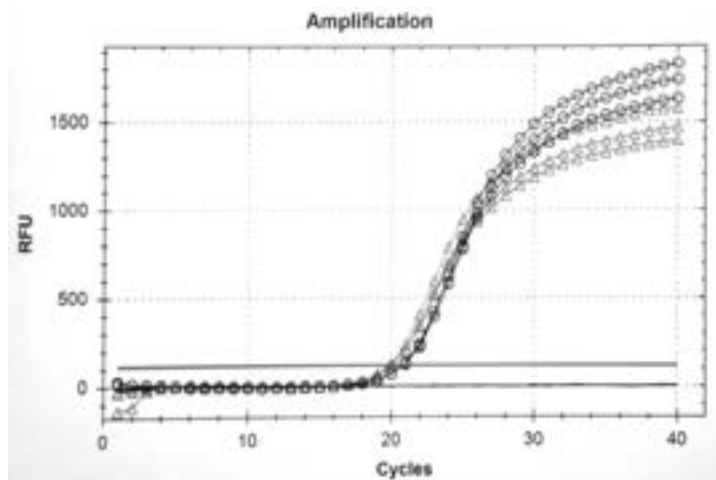
Tutti gli isolati di *Salmonella* spp. hanno mostrato resistenza ai seguenti antibiotici: Sulfametossazolo (SMX), Ampicillina (AMP) e Gentamicina (GEN). Otto isolati di salmonella su 10 (80%) testati hanno mostrato resistenza al Trimethoprim (TMP) e 8 (80%) sono risultati resistenti alla Ciprofloxacina (CIP).

La resistenza verso la Tetraciclina (TET) è stata rilevata in sei ceppi microbici sui dieci testati (60%). La resistenza verso l'Azitromicina (AZI) è stata riscontrata in 4 salmonelle (40%).

Sono state testate mediante Minima Concentrazione Inibente (MIC) sia il Cefotaxime (FOT) sia il Ceftazidime (TAZ): per il primo antibiotico solo due ceppi isolati (20%) sono risultati resistenti (4 g), mentre per il Ceftazidime non si sono riscontrate resistenze.

Gli isolati da sette campioni sono risultati resistenti all'Acido Nalidixico (70%). Nessuna salmonella isolata dai campioni ha mostrato resistenza verso il Meropenem (MERO).

Sei ceppi sui dieci testati (60%) hanno mostrato resistenza a Cloramfenicolo (CHL) e il 50% (cinque su dieci ) è risultato resistente alla Tigeciclina (TGC). Nove isolati (90%) hanno mostrato resistenza verso la Colistina (COL).  
Le indagini condotte con biologia molecolare non hanno rilevato la presenza del gene ESBL CTX-M in nessun ceppo isolato.



**Figura 2:** Indagini biomolecolari condotte con RTq-PCR sul gene CTX-M. Controlli positivi (rosso e blu), controllo negativo (nera)

*Figure 2: Biomolecular investigations conducted with RTq-PCR on the CTX-M gene. Positive controls (red and blue), negative control (black)*

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi del profilo fenotipico di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati è preoccupante: 4 antibiotici sono risultati inefficaci, nella fattispecie si tratta del 28,6% degli agenti testati, mentre i restanti farmaci hanno rivelato una efficacia variabile.

In particolare, tutti i campioni sono risultati resistenti ad almeno un agente antimicrobico. Questo dato manifesta la crescente dimensione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Nel 2000 Threlfall e altri autori consideravano il 35,2% dei ceppi resistenti ad almeno un farmaco, percentuale cresciuta, cinque anni più tardi, al 40,8% (Gill et al., 2005).

Il report dell'attività di EFSA-ECDC del 2011 segnala che i profili di resistenza espressi da salmonelle da fonte umana sono principalmente rivolte verso le tetracicline (27.1%), seguite dall' ampicillina (26.6%).

Il problema dell'antibiotico-resistenza è dunque un tema comune alla medicina veterinaria ed umana, tanto più preoccupante quanto più frequenti si fanno le segnalazioni delle multiresistenze (Rapporto EFSA-ECDC 2011). Il report dell'EFSA-ECDC sulla resistenza agli antibiotici in batteri zoonotici, che analizza i dati raccolti nel 2013, conferma che le possibilità di trattare le "food borne diseases" stanno diminuendo, poiché alcuni batteri continuano a manifestare resistenza ai farmaci antimicrobici.

I risultati di questo studio confermano che il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è un problema molto rilevante in Italia che merita l'applicazione di misure atte a prevenirne l'aumento e mettono l'accento sull'importanza di sviluppare l'uso consapevole e prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria.

Questo studio mette in evidenza il fenomeno della multifarmacoresistenza, ovvero la

resistenza a più antibiotici, in linea con altri studi effettuati in ambito italiano ed europeo. Dal confronto con gli esiti del rapporto di EFSA ed ECDC del 2017, emerge una distinzione con i risultati della presente ricerca, particolarmente per un aspetto: i ceppi di *Salmonella* spp. da noi testati, mostrano, infatti, una maggiore resistenza a colistina; mentre, dal rapporto di EFSA ed ECDC è stata riscontrata resistenza alla colistina a livelli molto bassi sia in *Salmonella* spp. che in *E. coli*, presenti in suini e bovini.

Gli esiti della presente ricerca associati alla scoperta del nuovo meccanismo di resistenza alla colistina nei batteri, causato dal gene MCR-1, inducono a pensare che, per ridurre questo fenomeno, l'utilizzo dell'antibiotico per uso veterinario andrebbe ridimensionato. A proposito di questo, bisogna ricordare che il 05/08/2016 il Ministro della Salute ha diramato la nota n. protocollo DGSAF 18992-P sull'uso responsabile della colistina in relazione al fenomeno della AMR. Il DM del 25/08/2016 ha poi decretato che la colistina è fosse ritirata dal commercio.

La presenza di *Salmonella* spp. nella filiera suina fornisce indicazioni utili sull'utilizzo di buone pratiche di gestione del sistema di autocontrollo adottato.

Per potere ridurre il numero di casi di salmonellosi umana bisognerebbe attuare delle misure preventive atte a garantire l'assenza di *Salmonella* negli allevamenti dei suini da riproduzione e nei mangimi loro somministrati, pulizia e disinfezione adeguate degli allevamenti, assenza di contaminazione durante la macellazione delle carcasse e misure di biosicurezza. Infine, bisognerebbe evitare lo stress degli animali, ad esempio agendo accuratamente sul loro trasporto dall'allevamento di origine al macello. Il tema della resistenza antimicrobica è altamente rilevante ad oggi, pertanto questo studio fornisce solamente ulteriori dati sul fenomeno dell'A-R correlati alla filiera suina. Questi saranno poi approfonditi da indagini di tipo genotipico, al fine di migliorare la comprensione di un fenomeno estremamente complesso e di difficile risoluzione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bianchi D.M., Gallina S., Sona B., Gennero M.S., Masoero L., Belvedere M.A., Decastelli L., *Salmonella nell'allevamento e nella filiera alimentare suina: indagine di prevalenza microbiologica e sierologica*, Large Animal Review, 2007, 13: 261-265
2. Gill, N., Reilly, B., Threlfall, J.,. *Surveillance of Enteric Pathogens in Europe and Beyond*, Enter-Net Annual report 2005, DGSANCO Unit C/3, Agreement N°2003203, pp-22-30
3. Lakshmi C., Revell P.A., *Prevalence and molecular characterization of extended-Spectrum-Beta-Lactamase producing Enterobacteriaceae in a pediatric patient population*, Antimicrobial Agent of Chemotherapy, Vol. 56, N.), 2012, pp. 4765-4770
4. Martelli P. et al , *Le Patologie del maiale*, le point veterinaire italie, 2013