

DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI 18 ANTIBIOTICI NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA CHOLERAESUIS*

EVALUATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF 18 ANTIBIOTICS AGAINST *SALMONELLA CHOLERAESUIS*

RUGNA G.¹, CEVIDALLI A.E.², D'INCAU M.¹, MERIALDI G.¹

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy

2 Intervet Schering-Plough Animal Health, Italy

Key Words: Minimum Inhibitory Concentration (MIC), *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar choleraesuis

Riassunto. È stata testata la sensibilità di 49 ceppi di *Salmonella choleraesuis* nei confronti di 18 antibiotici, valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) mediante tecnica della micro-diluizione in brodo. Tutti i ceppi sono risultati sensibili al ceftiofur (breakpoint (µg/ml): S≤2; I=4; R≥8), il 77,6% ha manifestato sensibilità nei confronti del florfenicolo (breakpoint (µg/ml): S≤2; I=4; R≥8). Tra gli antibiotici per cui non esistono valori di *breakpoint* viene riportata la distribuzione delle MIC (µg/ml) ottenute. Tra questi antibiotici, quelli che hanno mostrato valori di MIC₉₀ considerati compatibili con una buona efficacia *in vitro* sono risultati i fluorochinolonici (Enrofloxacin e Danofloxacin) e la gentamicina.

Abstract. Forty-nine *Salmonella choleraesuis* isolates were tested for susceptibility to 18 antimicrobials by micro-dilution broth method.

All the isolates resulted susceptible to ceftiofur (breakpoint (µg/ml): S≤2; I=4; R≥8) and 77,6% were susceptible to florfenicol (breakpoint (µg/ml): S≤2; I=4; R≥8). Regarding those antibiotics whose *breakpoint* values are not defined, the MIC distribution (µg/ml) is reported. Antimicrobials with low MIC₉₀ values were fluoroquinolones (enrofloxacin and danofloxacin) and gentamicin.

INTRODUZIONE

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar choleraesuis (*S. choleraesuis*) è un batterio patogeno ospite-specifico, causa nel suino di forme cliniche molto gravi, con tasso di letalità fino al 100% (Weide-Botjes *et al.*, 1996). L'infezione può essere associata a setticemia, enterocolite, localizzazione in organi con forme di polmonite ed epatite; occasionalmente può manifestarsi con meningite, encefalite e aborto (Griffith R.W. *et al.*, 2006). Durante gli anni '50 e '60, *S. choleraesuis* (compresa la variante Kunzendorf) era il sierotipo più comunemente isolato dal suino nel Mondo. Attualmente è ancora abbastanza presente in Nord America e Asia, ma viene rilevato piuttosto raramente in Australia e nei Paesi dell'Europa Occidentale (Fedorka-Cray *et al.*, 2000). Nonostante la prevalenza inferiore rispetto ad altri sierotipi, *S. choleraesuis* è anche nella nostra realtà causa di episodi di mortalità anche molto gravi, seppure sporadici.

Dal punto di vista epidemiologico, *S. choleraesuis* viene isolata da suini clinicamente ammalati, mentre raramente viene isolata dai mangimi o da altri serbatoi animali; la principale fonte di nuove infezioni è quindi rappresentata da soggetti eliminatori e

ambientati contaminati dalle feci di questi suini (Gray *et al.*, 1996).

Durante la fase acuta di malattia i maiali possono eliminare fino a 10^6 UFC di *S. choleraesuis* per grammo di feci. L'alta densità di animali, lo stress da trasporto, patologie carenziali o patologie infettive possono aumentare l'eliminazione da parte dei portatori ed innalzare la suscettibilità dei suini esposti. In infezioni sperimentali è stato dimostrato che *S. choleraesuis* persiste nella giunzione ileo-ciecale, nei linfonodi, nelle tonsille e nei polmoni fino a 12 settimane dall'infezione.

L'influenza degli antibiotici sulla durata e sulla frequenza di eliminazione di *Salmonella* spp. da parte di animali portatori è stata poco studiata. In campo umano è riconosciuto che la somministrazione di sostanze antimicrobiche prolunghi la durata dello stato di portatore; al contrario nel suino, una vigorosa terapia antibatterica nella prima fase di una setticemia causata da *S. choleraesuis* può significativamente ridurre l'intensità e la durata dell'eliminazione del microrganismo per via fecale (Gray *et al.*, 1996).

Nel caso della salmonellosi setticemica del suino da *S. choleraesuis*, lo scopo principale della terapia consiste nel minimizzare la gravità della forma clinica, limitare la diffusione dell'infezione e della malattia e prevenire la ricomparsa della malattia nel gruppo. Il raggiungimento di questi obiettivi è particolarmente difficile; *S. choleraesuis* è spesso resistente *in vitro* a molti antibiotici usati in clinica suina. Inoltre, durante la forma clinica, il microrganismo occupa una nicchia intracellulare inaccessibile a molti comuni antibiotici.

Il test di sensibilità agli antibiotici è particolarmente necessario nelle situazioni in cui l'agente patogeno appartiene a specie batteriche per le quali è stata documentata resistenza a sostanze comunemente usate nella pratica clinica.

Per tale motivo abbiamo valutato la sensibilità di 49 ceppi di *S. choleraesuis* nei confronti di 18 antibiotici appartenenti a diverse classi farmaceutiche, valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC). La scelta degli antibiotici è stata effettuata principalmente sulla base delle molecole comunemente usate nella clinica suina, compatibilmente con la disponibilità sul mercato di un kit commerciale.

Questo studio vuole fornire un contributo all'utilizzo consapevole degli antibiotici in medicina suina, fornendo indicazioni di sensibilità *in vitro* utili alla scelta del farmaco terapeutico, tenendo sempre presente che altre considerazioni, quali la distribuzione nei vari distretti dell'organismo e la via di somministrazione, hanno comunque notevole importanza.

MATERIALI E METODI

Lo studio include 49 ceppi di *Salmonella* sierotipo choleraesuis isolati nel corso del 2009 e collezionati dal Reparto di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Come controlli positivi sono stati usati tre microrganismi: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

La sensibilità antimicrobica degli isolati è stata determinata valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) con il metodo della microdiluzione in piastra, utilizzando un prodotto commerciale costituito da piastre a 96 pozzetti contenenti un pannello di antibiotici disidratati a diverse concentrazioni (Sensititre®: Trek Diagnostic System Inc). Gli agenti antimicrobici utilizzati con le rispettive diluizioni d'uso sono stati i seguenti: ceftiofur (TIO) 0,25-8 µg/ml; gentamicina (GEN) 1-16 µg/ml; florfenicolo (FFN) 0,25-8 µg/ml; tiamulina (TIA) 0,5-32 µg/ml; clortetraciclina (CTET) 0,5-8 µg/ml; ossitetraciclina (OXI) 0,5-8 µg/ml; penicillina (PEN) 0,12-8 µg/ml; ampicillina (AMP) 0,25-16 µg/ml; danofloxacin (DANO) 0,12-1 µg/ml; neomicina (NEO) 4-32 µg/ml; trimethoprim/sulfametossazolo (SXT) 2/38 µg/ml; spectinomicina (SPE) 8-64 µg/ml;

ml; tilosina tartrato (TYLT) 0,5-32 g/ml; tularomicina (TUL) 1-64 g/ml; tilmicosina (TIL) 4-64 g/ml; clindamicina (CLI) 0,25-16 g/ml; sulfadimetossina (SDM) 256 g/ml; enrofloxacin (ENRO) 0,12-2 µg/ml.

L'altestimento e la valutazione della MIC sono stati effettuati secondo le raccomandazioni del CLSI. Il valore della MIC è stato considerato come la minima diluizione di antibiotico in grado di inibire una crescita batterica visibile. Per tutti i microrganismi testati sono stati annotati i valori di MIC di ciascun principio attivo. Per gli antibiotici per cui esistono valori di *breakpoint* raccomandati dal CLSI specifici per *S. Choleraesuis*, vale a dire ceftiofur e florfenicolo, sono state calcolate le percentuali di sensibilità (%S), resistenza (%R) e di risposta intermedia (%I). Per i rimanenti antibiotici, per i quali tale valore non è disponibile, è stata considerata la distribuzione dei ceppi batterici nel range di MIC ottenuto.

RISULTATI

La Tabella 1 mostra la distribuzione dei valori di MIC (µg/ml) dei 18 antibiotici testati nei confronti dei 49 ceppi di *S. choleraesuis*. Per quanto riguarda gli antibiotici per cui sono presenti dei valori di *breakpoint*, si osserva un elevato grado di attività antimicrobica per il ceftiofur, che presenta il 100% di efficacia *in vitro* nei confronti dei ceppi testati. Una buona attività *in vitro* nei confronti del microrganismo in oggetto viene riscontrata anche per il florfenicolo, con il 77,6% di ceppi sensibili.

Tabella 1. Distribuzione dei valori di MIC (µg/ml) di 18 antibiotici testati nei confronti di 49 ceppi di *S. choleraesuis*

Antibiotico	MIC (µg/ml)												%S	%I	%R			
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256				512		
Ampicillina				3					46(≥32)									
Ceftiofur			7	38	4											100		
Clindamicina									49(≥32)									
Clortetraciclina						3		46(≥16)										
Danofloxacin	38	2	1	8														
Enrofloxacin	37	3		9														
Florfenicolo			1	1	33	3	4	7(≥16)								77,6	8,2	14,3
Gentamicina				46	1		2											
Neomicina						8				41(≥64)								
Ossitetraciclina					2	1		46(≥16)										
Penicillina							3	46(≥16)										
Spectinomina									7	27	15(≥128)							
Sulfadimetossina												3	46(≥512)					
Tiamulina									1	48(≥64)								
Tilmicosina								1			48(≥128)							
Tilosina							49(≥8)											
Trimet/Sulfamet (2/38)					6													
Tularomicina						1	36	8	3			1(≥128)						

Sui principi attivi per i quali non è possibile determinare l'attività in termini di sensibilità/resistenza a causa della mancanza di valori di *breakpoint*, è possibile fare alcune considerazioni osservando i valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ riscontrati (Tabella 2).

Entrambe le tetraciline testate (ossitetraciclina e clortetraciclina) manifestano una scarsa attività antimicrobica nei confronti di *S. choleraesuis*, presentando valori di MIC₉₀ e MIC₅₀ superiori a 16 µg/ml. Anche per i beta-lattamici, la clindamicina, la neomicina, i macrolidi e il trimetoprim+sulfamidici, la maggior parte dei ceppi testati manifestano resistenza fino alle più alte concentrazioni testate.

I fluorochinoloni (danofloxacin ed enrofloxacin) e la gentamicina presentano valori di MIC₉₀ molto bassi.

Tabella 2. Valori di MIC₅₀ (µg/ml) e MIC₉₀ (µg/ml) degli antibiotici testati

Antibiotico	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillina	>16	>16
Ceftiofur	1	1
Clindamicina	>16	>16
Clortetraciclina	>8	>8
Danofl oxacina	<0,12	1
Enrofloxacin	<0,12	1
Florfenicolo	2	>8
Gentamicina	<1	<1
Neomicina	>32	>32
Ossitetraciclina	>8	>8
Penicillina	>32	>32
Spectinomocina	64	>64
Sulfadimetossina	>256	>256
Tiamulina	>32	>32
Tilmicosina	>64	>64
Tilosina	>4	>4
Trimet/Sulfamet	>2/38	>2/38
Tulatromicina	8	16

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tra gli antibiotici testati è risultata una efficace attività da parte di una cefalosporina come il ceftiofur (100% dei ceppi sensibili). Il florfenicolo è risultato efficace sulla maggioranza dei 49 ceppi di *S. choleraesuis* (77,6%). MIC₉₀ compatibili con una elevata efficacia *in vitro* sono state evidenziate anche per i fluorochinoloni e la gentamicina. Questi dati concordano in parte con i pochi dati riscontrati in bibliografia; in particolare in una ricerca condotta in Taiwan (Chao-Fu *et al.*, 2004) i valori di MIC riscontrati per i fluorochinoloni sono sovrapponibili a quelli ottenuti in questo studio; al contrario, i ceppi di *S. choleraesuis* da noi esaminati hanno mostrato una maggiore sensibilità *in vitro* alla Gentamicina. A questo proposito è importante considerare che è stato segnalato l'emergere di ceppi di *S. choleraesuis* resistenti ai fluorochinoloni ed alle cefalosporine ad ampio spettro. Tale evenienza è stata riportata in Giappone (Hidetake *et al.*, 2004), in Taiwan (Chiu *et al.*, 2004) ed in Thailandia (Kulwichit *et al.*, 2007). In questi ultimi due Paesi è probabile che l'utilizzo di questo tipo di antibiotici come promotori di crescita abbia potuto portare all'emergere di fenomeni di resistenza. Appare inoltre interessante, dai nostri risultati, la scarsa efficacia della neomicina che, pur appartenendo alla classe degli aminoglicosidi, ha mostrato valori di MIC più elevati rispetto alla gentamicina.

Tra gli antibiotici esaminati, si osserva che la Sulfadimetossina ha efficacia nulla nei confronti di tutti i ceppi testati (MIC₅₀ ≥ 256 µg/ml), così come l'associazione trimethoprim e sulfamidico (sulfametossazolo) ed i macrolidi. Anche i beta-lattamici utilizzati presentano valori di MIC piuttosto elevati.

La scelta dell'antibiotico da utilizzare nella terapia di questa malattia non può basarsi solo su considerazioni di farmaco-dinamica (quali l'attività inibente *in vitro*) ma deve considerare diversi aspetti relativi alla farmaco-cinetica. Fra questi i più importanti sono, a nostro giudizio, la capacità del farmaco di raggiungere il batterio e la via di somministrazione.

Per quanto riguarda il primo aspetto, è da tener presente che nella patogenesi della salmonellosi gioca un ruolo importante la capacità di replicazione intracellulare del batterio, soprattutto in cellule immunitarie come macrofagi e cellule dendritiche (Foley & Lynne, 2008), che ne permettono la diffusione nei vari distretti organici. Ne consegue l'importanza dell'utilizzo di

sostanze antimicrobiche che abbiano buone caratteristiche di penetrazione in cellule ospiti, caratteristica farmacocinetica dimostrata per esempio per il florfenicolo (Soto *et al.*, 2010) ed i fluorochinoloni (Goodman and Gilman, 2006).

Per quanto riguarda la via di somministrazione, l'uso di antibiotici sistemici per il trattamento della salmonellosi setticemica è ampiamente praticato ed è efficace nell'attenuare la gravità della patologia, mentre farmaci che, pur essendo attivi *in vitro*, non sono assorbiti a livello intestinale dopo somministrazione orale (es. gentamicina) appaiono meno indicati. Le formulazioni iniettabili sono spesso utilizzate su suini che hanno la forma clinica, permettendo di aumentarne il tasso di sopravvivenza. La medicazione orale (mangime o acqua da bere) non è di solito sufficiente per trattare i suini clinicamente ammalati, dal momento che questi ultimi mangiano poco e spesso non consumano acqua a sufficienza per il raggiungimento della dose farmacologica efficace. La medicazione orale, però, iniziata nelle fasi precoci di un focolaio contribuisce a ridurre il numero di nuovi casi, diminuendo l'eliminazione con le feci ed aumentando la dose infettante richiesta per infettare i soggetti dei box sani.

BIBLIOGRAFIA

- Chao-Fu C., Lin-Chu C., Yung-Fu C., Michael C., Tai-Sheng C. (2004) Antimicrobial Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* **14**: 153–157
- Chiu C.H., Wu T.L., Su L.H., Chu C., Chia J.H., Kuo A.J., Chien M.S., Lin T.Y. (2004) Isolation of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Lancet*, **363**: 1285-1286
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards -3a ed., M31-A3, Vol 28 No. 8
- Fedorka-Cray P.J., Gray J.T., Wray C. (2000) “Salmonella infections in pigs” in: Wray C., Wray A. (eds) “Salmonella in domestic animals”. CAB International, Wallingford, pp 1191–1207
- Foley S.L., Lynne A.M. (2008) Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.*, **86**: E173-E187
- Goodman L.S., Gilman A. (2006) The Pharmacological basis of therapeutics, 11th ed., MacGraw-Hill, Chapter 42
- Gray J.T., Fedorka-Cray P.J., Stabel T.S., Kramer T.T. (1996) Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 141–146
- Griffith R.W., Schwartz K.J., Meyerholz D.K. (2006) “Salmonella” in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 9th ed., Blackwell Publishing, pp 739-754
- Hidetake E., Ayako M., Kanako I., Akemi K., Sanae S., Yutaka T., Toshio T. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 266–270
- Kulwichit W., Chatsuwat T., Unhasuta C., Pulsrikarn C., Banktrakulnonth A., Chongthaleong A. (2007) Drug-resistant nontyphoidal *Salmonella* bacteremia. *Thailand. Emerg. Infect. Dis.*, **13**: 501-502
- Soto E., Endris R.G., Hawke J.P. (2010) In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**: 4664–4670
- Weide-Botjes M., Liebisch B., Schwarz S., Watts J.L., (1996) Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar choleraesuis field isolates and differentiation from homologous live vaccine strains suisaloral and SC-54. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2460–2463.