

SENSIBILITÀ AGLI AGENTI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI *Listeria monocytogenes* ISOLATI DAGLI ALIMENTI

SUSCEPTIBILITY OF *Listeria monocytogenes* STRAINS ISOLATED FROM FOOD TO ANTIMICROBIAL AGENTS

Conter M.¹, Paludi D.², Mureddu A.³, Zanardi E.¹, Ghidini S.¹, Ianieri A.¹

¹ Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma

² Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo

³ Dipartimento di Biologia Animale, Università di Sassari

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the susceptibility of 40 *L. monocytogenes* strains isolated from seafood and processing environments to 19 antibiotics currently used in veterinary and human therapy. Susceptibility tests were performed by the automated system VITEK2. Apart from Penicillin, Ampicillin and Trimethoprim-Sulfamethoxazole, for which clinical breakpoint for *Listeria* susceptibility testing are defined according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), in the present study the CLSI criteria for staphylococci were applied. This study shows that isolated *L. monocytogenes* strains are susceptible to the antibiotics commonly used in veterinary and human listeriosis treatment. Very few strains (7,5%) showed a resistance behaviour towards Oxacillin, whereas a variable pattern was showed for Ciprofloxacin and Moxifloxacin. Moreover, an increase in tetracycline resistance, reported by several authors, can not be confirmed in this study, probably due to the different sources of strains isolation. At last, the VITEK2 system represents a rapid and easy-to-use means for antimicrobial susceptibility test of *Listeria monocytogenes*. In conclusion, because of the increase of antimicrobial resistance showed by *L. monocytogenes*, a continuous surveillance of emerging antimicrobial resistance among this pathogen is important to ensure effective treatment of human listeriosis. These data can be used for improve background data on antibiotic resistance of strains isolated from food and food environment, even considering the lack of clinical breakpoint provided by the CLSI.

Key words

Listeria monocytogenes; Antimicrobial resistance; MIC; Seafood; Vitek2.

INTRODUZIONE

La listeriosi è una patologia causata da *Listeria monocytogenes*, un microrganismo ampiamente diffuso nell'ambiente, che può contaminare i vegetali, le carni, i prodotti ittici, il latte ed i prodotti derivati (1). Questa situazione contribuisce a diffondere il microrganismo lungo l'intera filiera alimentare (2, 3). Mentre l'esposizione al microrganismo è piuttosto comune (4), l'insorgenza della patologia, generalmente, non causa sintomi o si manifesta nella forma enterica simil-influenzale con febbre, vomito e diarrea ed eliminazione del patogeno attraverso le feci (5). Nelle fasce di popolazione a rischio (neonati,

donne gravide, anziani, pazienti immunocompromessi) sono note due forme morbose principali: listeriosi perinatale e listeriosi degli adulti. In entrambi i casi le forme cliniche corrispondono ad una infezione disseminata ed a forme localizzate al sistema nervoso centrale (6). Sono riconosciute anche forme atipiche caratterizzate da endocarditi, miocarditi, arteriti, polmoniti, epatiti, artriti (6). Il numero di casi di listeriosi alimentare è aumentato progressivamente negli ultimi anni (7), anche a causa dei cambiamenti nello stile alimentare. Per questi motivi una diagnosi precoce di listeriosi e una terapia antimicrobica appropriata sono fondamentali.

L. monocytogenes è sensibile alla maggior parte degli agenti antimicrobici (8). Il trattamento di elezione è costituito generalmente da un -lattamico (ad es. ampicillina o penicillina G), eventualmente associato (nei pazienti immunocompromessi) ad un aminoglicoside (gentamicina) (4). Il trattamento di seconda scelta è costituito dall'associazione tra il trimetoprim e un sulfonamide (quale, ad esempio, il sulfametossazolo), soprattutto per i pazienti allergici ai -lattamici (9). Dopo il primo isolamento di un ceppo multiresistente di *L. monocytogenes* nel 1988 (10), sono stati isolati altri ceppi resistenti ad uno o più antibiotici (9, 11, 12), quali, ad esempio, tetraciline, gentamicina, penicillina, ampicillina, streptomina, eritromicina, ecc. Vari autori (13, 14, 15) hanno evidenziato una frequenza sempre maggiore di ceppi resistenti a vari antibiotici, indicando, conseguentemente, la necessità di monitorarne il comportamento.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la minima concentrazione inibente (MIC) dei principali agenti antimicrobici impiegati in terapia umana e veterinaria, nei confronti di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti ittici e ambienti di lavorazione.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati considerati 40 ceppi di *L. monocytogenes*, di cui 32 provenienti da prodotti ittici e 8 dai relativi ambienti di lavorazione. Sono stati utilizzati, inoltre, 6 ceppi di riferimento (ATCC 7644, 15313, 19111, 19114, 19115 e NCTC 11994). Tutti i ceppi (ad eccezione di quelli di riferimento) sono stati isolati ed identificati con la metodica UNI EN ISO 11290-1 ed in seguito sono stati sottoposti al test di sierotipizzazione usando *Listeria* Antisera "SEIKEN" (Denka Seiken, Tokyo, Japan) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. Gli isolati sono, in seguito, stati sottoposti a multiplex PCR per l'identificazione di genere e di specie (16).

Per il test di sensibilità agli antibiotici è stato impiegato il sistema automatizzato VITEK2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Dai ceppi coltivati in Trypticase Soy Agar (TSA) (Oxoid, Milano, Italia) sono state allestite sospensioni con torbidità pari a 0,5 McFarland in soluzione salina allo 0,45%. Le sospensioni sono state utilizzate per caricare le card dello strumento, seguendo le istruzioni del produttore. Sono state utilizzate le card AST-P535, la cui composizione è riportata in tabella 1, progettate per la valutazione della resistenza antimicrobica di sta-

filococchi ed enterococchi, non essendo prodotte card specifiche per il genere *Listeria*. Per la definizione della sensibilità nei confronti delle penicilline e degli inibitori del ciclo metabolico dei folati sono stati considerati i breakpoint forniti dal Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (17, 18). Negli altri casi, non essendoci limiti per *L. monocytogenes*, sono stati considerati i criteri del CLSI per gli stafilococchi coagulasi negativi (8). A questo scopo, sono stati considerati i seguenti ceppi di controllo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

I dati ottenuti sono stati elaborati e convertiti in variabili nominali e in variabili continue. Su questi valori è, quindi, stato possibile eseguire l'analisi statistica utilizzando il software SPSS (Chicago, IL, USA) ver. 13.0.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare la sensibilità antimicrobica di 40 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti e ambienti di lavorazione. Il range delle MIC degli antibiotici testati è riportato nella Tabella 1.

Dei 40 ceppi considerati, la maggioranza (57,5%) apparteneva ai sierotipi 1/2a, il 20% al 1/2b, il 10% al 4b, il 7,5% al 1/2c e il rimanente al 4b/4e.

La maggior parte dei ceppi era sensibile alla gran parte degli antimicrobici testati (tabella 1). Non è stata trovata nessuna correlazione statistica tra il comportamento dei ceppi isolati e il sierotipo o l'origine degli stessi. Tutti i ceppi si sono rivelati sensibili alle tetraciline, agli aminoglicosidi, ai macrolidi, ai glicopeptidi ed all'associazione trimetoprim-sulfametossazolo. Tra i -lattamici, la benzilpenicillina, era la più efficace, visto che la MIC era mediamente di 0,25 g/ml. Tre ceppi (7,5%) erano resistenti all'oxacillina. Di questi, due sono stati isolati da prodotti, mentre uno dall'ambiente di lavorazione. Alcuni autori (8, 19) riportano percentuali di resistenza per questa molecola, decisamente più alte, anche se un confronto è difficile, considerando che nessuno degli autori citati ha analizzato ceppi isolati da prodotti ittici. Come atteso, tutti i ceppi erano, al contrario, resistenti alla fosfomicina e all'acido fusidico. Comportamenti variabili sono stati evidenziati relativamente ai chinoloni ed ai lincosamidi. In particolare, per la ciprofloxacina, la maggior parte di ceppi (95%) era sensibile, ma un ceppo mostrava una resistenza intermedia e un altro era resistente. Per la moxifloxacina la variabilità è stata ancora

maggiore: il 60% dei ceppi era sensibile, mentre il 40% mostrava un comportamento intermedio. Infine, relativamente ai lincosamidi, un solo ceppo aveva un comportamento intermedio nei confronti della clindamicina, mentre tutti gli altri erano sensibili. In generale, i valori ottenuti in questo studio sono simili a quelli riportati da altri autori (20). Al contrario, non possiamo confermare l'aumento della resistenza alle tetracicline, ampiamente riportato in letteratura (9, 13, 14). Nessuno dei ceppi considerati nel nostro studio, infatti, era resistente a questo antibiotico. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che molto spesso viene riportato il comportamento di *L. monocytogenes* nel caso di ceppi isolati da carni ottenute da bovini, suini o pollame, che frequentemente vengono trattati in allevamento con varie sostanze antimicrobiche, anche come supplementa-

zione con i mangimi. Questa evenienza è, al contrario, meno frequente nel caso di prodotti ittici d'allevamento e addirittura impossibile per i prodotti pescati. Infine, l'impiego del sistema automatizzato VITEK2 per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici, ha permesso standardizzare le operazioni e di rendere rapido l'ottenimento dei risultati.

In conclusione, il presente studio rappresenta un apporto alle conoscenze relative alla sensibilità naturale di *L. monocytogenes* nei confronti dei maggiori presidi antimicrobici. Lo studio dell'antibiotico-resistenza dei patogeni zoonotici è, infatti, un tema di grande attualità: questi dati forniscono, infatti, utili informazioni sia a fini epidemiologici, sia al fine di facilitare la scelta degli antibiotici verso i quali è presente una maggiore sensibilità naturale, al fine di migliorare il trattamento nel corso di infezione.

Tabella 1: composizione della card AST-P535 e profilo della sensibilità antimicrobica

Antimicrobico	Range (µg/ml)	Numero di isolati (%)		
		R	I	S
Penicillina	0,03-0,5	0	0	100
Ampicillina	2-32	0	0	100
Ampicillina/Sulbactam	2-32	0	0	100
Oxacillina	0,25-4	7,5	0	92,5
Imipenem	1-16	0	0	100
Gentamicina	0,5-16	0	0	100
Ciprofloxacina	0,5-8	2,5	2,5	95
Moxifloxacina	0,25-8	0	60	40
Eritromicina	0,25-8	0	0	100
Clindamicina	0,25-8	0	2,5	97,5
Chinupristina/Dalfopristina	0,25-16	0	0	100
Linezolid	0,5-8	0	0	100
Teicoplanina	0,5-32	0	0	100
Vancomicina	1-32	0	0	100
Tetraciclina	1-16	0	0	100
Fosfomicina	8-128	100	0	0
Acido Fusidico	0,5-32	100	0	0
Rifampicina	0,5-32	0	0	100
Trimetoprim/Sulfametossazolo	10-320	0	0	100

BIBLIOGRAFIA

- 1) Farber J.M. e Peterkin P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiology Review* 55, 476-511.
- 2) Giovannacci I., Ragimbeaub C., Queguinerb S., Salvatb G., Vendevrea J.-L., Carlierc V. e Ermel G., 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants, use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology* 53, 127-140.
- 3) Jorgensen L.V. and Huss H.H., 1998. Prevalence and growth of *L. monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*. 42, 127-131.
- 4) Hof H., 2003. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35, 199-202.
- 5) Swaminathan B., e Gerner-Smidt P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243.
- 6) Doganay M., 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35, 173-175.
- 7) Rocourt J., Jacqueta C. and Reilly A., 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 62, 197-209.
- 8) Troxler R., Von Graevenitz A., Funke G., Wiedemann B., Stock I., 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species : *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 6, 525-535.
- 9) Charpentier E., Gerbaud G., Jacquet C., Rocourt J. and Courvalin P., 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *Journal of Infectious Diseases* 172, 277-281.
- 10) Poyart-Salmeron C., Carlier C., Trieu-Cuot P., Courtieu A.L. and Courvalin P., 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *The Lancet* 335, 1422-1426.
- 11) Hadorn K., Hachler H., Schaffner A. and Kayser F.H., 1993. Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12, 928-937.
- 12) Franco Abuin C.M., Quinto Fernandez E.J., Fente Sampayo C., Rodriguez Otero J.L., Dominguez Rodriguez L. and Cepeda Saez A., 1994. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 1655-1657.
- 13) Charpentier E. and Courvalin P., 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2103-2108.
- 14) Walsh D., Duffy G., Sheridan J.J., Blair I.S. e McDowell D.A., 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology* 90, 517-522.
- 15) Vitas A.I., Sanchez R.M., Aguado V. E Garcia-Jalon I., 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. *Journal of Food Protection* 10, 2402-2406.
- 16) Conter M., Di Ciccio P., Zanardi E., D'Orto V., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A. (2007). Caratterizzazione genotipica e sierologica di *Listeria monocytogenes* isolata da alimenti e ambienti di lavorazione. XVII Convegno Nazionale AIVI. Atti del congresso, pp. 323-327.
- 17) CLSI 2006a. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline (M45-A, Vol. 26 No. 19). CLSI, Wayne, PA.
- 18) CLSI 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. (M100-S16, Vol 26 No 3). CLSI, Wayne, PA.
- 19) Safdar A. e Armstrong D. 2003. Antimicrobial Activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). *Journal of Clinical Microbiology* 41, 483-485.
- 20) Aureli P., Ferrini A.M., Mannoni V., Hodzic S., Wedell-Weergaard C, Oliva B., 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 83, 325-330.