

FARMACOSENSIBILITÀ DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* NETB POSITIVI E NETB NEGATIVI ISOLATI DA POLLO E DIFFUSIONE DI ALCUNI GENI DI RESISTENZA

Bano L., Bacchin C., Marcon B., Drigo I., Bonci M., Agnoletti F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

ABSTRACT - Antimicrobial susceptibility and distribution of *tet* and *erm* resistance genes among *netB* positive and *netB* negative *Clostridium perfringens* isolates of chicken origin.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of six antimicrobial agents was determined for 30 *netB* positive and 30 *netB* negative *C. perfringens* field strains of chicken origin, isolated from 2005 to 2009 in Italy. 53 strains were isolated from broilers and 7 from layer hens affected by enteric disorders, in 60 different farms. The occurrence of the tetracycline resistance genes *tetK*, *tetL*, *tetM* and macrolide resistance genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, was determined for all isolates by PCR. All strains tested susceptible to amoxicillin and tiamulin with MICs ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Susceptibility to tetracycline was found in only 16.6% of tested strains and *tetM* gene was detected in two resistant strains. 81.7% of strains showed MICs values in the range of susceptibility for tylosin (0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$) but slightly-resistant (2-16 $\mu\text{g/ml}$) and high-resistant (≥ 512 $\mu\text{g/ml}$) sub-populations were observed. *ErmB* gene was detected in 2 strains positive also for *tetM* gene, irrespective of tylosin susceptibility. A bimodal distribution of MICs was seen with zinc-bacitracin: 80% of strains resulted susceptible and 20% resistant. Resistance to lincomycin was found in the 71.6% of tested strains. No significant differences in MICs values were observed with respect to broiler or layer hens origin and *netB* gene presence.

Introduzione

Il bando dell'utilizzo dei promotori di crescita nei mangimi degli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, in vigore in Europa già dal 2006, ha determinato nel pollo da carne un aumento dell'incidenza delle patologie sostenute da clostridi e, in particolare, di quelle enteriche che vedono implicato *Clostridium perfringens* (enterite necrotica e disbatteriosi) (Van Immerseel *et al.*, 2009). Il controllo di queste infezioni è affidato ad antibiotici attivi nei confronti di microrganismi Gram-positivi, fra i quali i beta-lattamici, i macrolidi, le tetracicline, le pleuromutiline, i lincosamidi e, fuori Europa, la zinco-bacitracina.

L'impiego di tali farmaci dovrebbe essere mirato nei confronti del ceppo di *C. perfringens* isolato in corso di malattia e caratterizzato per quanto riguarda la presenza di alcuni markers genetici di patogenicità, quali il gene che codifica la tossina NetB, ritenuta uno dei fattori di virulenza fondamentali nella comparsa dell'enterite necrotica del pollo (Keyburn *et al.*, 2008).

Secondo il Clinical Laboratory Standard Institute per valutare la farmacosenibilità dei clostridi è necessario fare ricorso alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) mediante diluizione in agar; questo

metodo, tuttavia, richiede tempi lunghi, spesso non compatibili con le esigenze del veterinario di campo. Per questo motivo si rende necessario il monitoraggio periodico della sensibilità dei ceppi di *C. perfringens* isolati in corso di malattia (Johansson *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009; Watkins *et al.* 1997). Oggi, inoltre, è possibile studiare la farmacosenibilità batterica mediante tecniche di biologia molecolare che consentono di evidenziare la presenza di alcuni geni di resistenza. I geni di resistenza più frequentemente diffusi nel genere *Clostridium* sono *tetK*, *tetL*, *tetM* per le tetracicline ed il gene *ermC* per i macrolidi (Roberts, 2003). Con il presente studio si è voluta indagare la farmacosenibilità di ceppi di *C. perfringens* *netB* positivi e *netB* negativi isolati da pollo, attraverso la determinazione della MIC e la ricerca di alcuni geni di resistenza alle tetracicline ed ai macrolidi.

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Sono stati selezionati 60 ceppi di *C. perfringens* (30 *netB* positivi e 30 *netB* negativi) provenienti da 60 aziende diverse, isolati tra il 2005-2009, ed ottenuti da ovaiole (7 ceppi) e polli da carne (53 ceppi) con lesioni a carico dell'apparato gastroenterico. Gli isolamenti sono stati ottenuti in terreno Perfringens Agar Base (Oxoid) addizionato con il selettivo SFP (Shahidi-Ferguson-Perfringens Selective Supplement, Oxoid) e globuli rossi di montone (5%, v/v), mentre per la determinazione del gene *netB* è stata impiegata la PCR secondo il protocollo proposto da Keyburn (2008). I ceppi batterici erano stati conservati -80 °C in cryo-banks (Nalgene) fino al momento delle analisi.

Determinazione della minima concentrazione inibente

Per la determinazione della MIC è stato utilizzato il metodo della diluizione in agar secondo il protocollo riportato nel manuale CLSI M11-A7 (2007). I principi attivi esaminati sono stati: amoxicillina (amoxicilin powder, A8523, Sigma), tilosina (tylosin tatrtrate powder, T6134, Sigma), tiamulina (tiamulin fumarate powder, 46959, Sigma), tetraciclina (tetracycline hydrochloride powder, T4062, Sigma), lincomicina (lincomycin hydrochloride powder, 62143, Sigma), zinco-bacitracina (bacitracin zinc salt from *Bacillus licheniformis*, B5150, Sigma); gli standard analitici sono stati solubilizzati secondo le istruzioni del produttore. Come terreno base è stato impiegato il Brucella Agar (Oxoid) supplementato con emina (5 µg/ml), vitamina K (1 µg/ml) e sangue di montone laccato (5% v/v). Ciascun farmaco è stato incluso nel terreno a concentrazioni comprese tra 0,06 e 512 µg/ml e gli inoculi sono stati allestiti da sospensioni batteriche con torbidità pari a 0,5 McFarland. Le piastre inoculate sono state incubate a 35-37 °C per 48h in condizioni di anaerobiosi.

I risultati sono stati espressi in µg/ml e, per ciascun farmaco, è stata calcolata la MIC in grado di inibire la crescita del 50% e del 90% dei ceppi testati (MIC₅₀ e MIC₉₀ rispettivamente) nonché la media geometrica delle MIC.

I ceppi di riferimento *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285 sono stati inseriti in ogni piastra come controllo.

Ricerca dei geni di resistenza tet e erm

Cinque colonie di ciascun ceppo di *C. perfringens* sono state risospese in PBS. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit Magmax Total Nucleic Acid Isolation (Ambion) e l'estrattore automatico Microlab Starlet (Hamilton). Sono stati ricercati i geni di resistenza alle tetracicline denominati *tetK*, *tetL*, *tetM*, e i geni di resistenza ai macrolidi *ermA*, *ermB*, *ermC* applicando i protocolli riportati in letteratura (Ng *et al.*, 2001; Jae-Hyuk *et al.*, 2009). I controlli positivi per i geni *tet* e *erm* sono stati gentilmente forniti rispettivamente dal Dr. Schwaiger della facoltà di microbiologia dell'università di Monaco (Germania) e dal Dr. Morelli della facoltà di Agraria di Piacenza.

Risultati

Minima concentrazione inibente

La distribuzione delle MIC, le MIC₅₀ e le MIC₉₀ delle molecole testate sono riportate in tabella 1.

Le MIC di tiamulina, amoxicillina, tilosina e zinco-bacitracina nei confronti dei ceppi di campo di *C. perfringens*, sono risultate molto simili alle minime concentrazioni degli stessi principi attivi che hanno inibito il ceppo di riferimento ATCC 13124. Al contrario le MIC di lincomicina e tetraciclina nei confronti dei ceppi di campo sono risultate superiori a quelle ottenute verso il ceppo di riferimento, rispettivamente di due e otto diluizioni (tabella 2).

Non sono state osservate differenze significative di farmacosenibilità né tra i ceppi *netB* positivi e *netB* negativi, né tra ceppi isolati da polli da carne o ovaiole.

Geni di resistenza tet e erm

In due ceppi è stata evidenziata la simultanea presenza del gene di resistenza alle tetracicline *tetM* e del gene di resistenza ai macrolidi *ermB*. Uno di questi ceppi è inoltre risultato positivo al gene di resistenza alle tetracicline *tetL*.

Discussione e Conclusioni

Rispetto a studi simili condotti in altri paesi, le differenze maggiori hanno riguardato i valori di MIC della tetraciclina che in questo lavoro sono risultate tendenzialmente superiori rispetto a quelli registrati in Danimarca, Norvegia e Svezia, ma in linea rispetto a quelli ottenuti in Belgio e Brasile (Johansson *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2009). Infatti, secondo i criteri interpretativi riportati nel manuale del CLSI (2007), solo il 16% dei ceppi testati si è dimostrato sensibile alla tetraciclina, considerata molecola marker per la valutazione della farmacosenibilità della famiglia delle tetracicline, mentre il 35% è risultato intermedio e il 48,4% resistente. Tra i ceppi resistenti alla tetraciclina, solo 2 possedevano il gene di resistenza *tetM*, che codifica l'omonima proteina responsabile della protezione del ribosoma dall'azione delle tetracicline (Chopra and Roberts, 2001). Questa discrepanza tra risultati fenotipici e genotipici non sorprende ed è legata alla complessità dei fattori, non solo genetici, che regolano le resistenze di un microrganismo ad un antimicrobico.

L'amoxicillina è la molecola che ha dimostrato la più elevata attività *in vitro* con MIC₅₀ ≤ 0,125 µg/ml e MIC₉₀ = 0,032 µg/ml. Questi valori cadono al disotto del break

point di sensibilità fissato per l'ampicillina in 0,5 µg/ml (CLSI, 2007). Questo risultato, evidenziato anche in altri studi condotti su ceppi di pollo, differisce da quanto osservato nel bovino, ove sono stati osservati valori di MIC₉₀ più elevati nei confronti delle penicilline (Sasaki *et al.*, 2001).

La tiamulina è una molecola scarsamente utilizzata nell'allevamento del pollo da carne in virtù della sua incompatibilità dose-dipendente con alcuni ionofori impiegati comunemente per il contenimento della coccidiosi, ma potrebbe trovare spazio in quegli allevamenti di broiler dove è stato intrapreso un approccio vaccinale nei confronti della coccidiosi, o nella terapia dell'enterite necrotica sporadicamente osservata negli allevamenti di ovaiole (Dhillon *et al.*, 2004). Per tale principio attivo non esistono dei break points ufficiali (CLSI) e, adottando quelli proposti da Giguère (2006) che classifica come sensibili i ceppi batterici con MIC ≤ 4 µg/ml, tutti i ceppi da noi esaminati risultano sensibili. Per la famiglia dei macrolidi è stata saggiata la tilosina che trova largo impiego negli allevamenti del pollo, e specialmente in quelli di ovaiole, grazie alla sua efficacia nei confronti di micoplasmi e di batteri Gram-positivi. Per ovviare alla mancanza di break points ufficiali (CLSI) per la tilosina, è possibile adottare i criteri proposti da Johanson *et al.* (2004), che suggerisce di basarsi sulla distribuzione bimodale delle MIC. Per questa molecola sono state osservate tre subpopolazioni (grafico 1) con MIC nettamente separate da almeno 2 diluizioni.

La prima popolazione, che può essere definita "sensibile", raggruppa l'81,7% dei ceppi con valori di MIC ≤ 0,25 µg/ml; la seconda popolazione è costituita dal 15% dei ceppi con valori di MIC compresi tra 2 e 16 µg/ml e può essere definita "intermedia" o "moderatamente resistente" mentre il 3,3% dei ceppi presenta valori di MIC ≥ 512 µg/ml e può indubbiamente essere considerata "resistente". A quest'ultima popolazione appartiene anche uno dei due ceppi risultati positivi in PCR al gene *ermB*, mentre l'altro ceppo positivo ricade nel range di sensibilità. In base a questo risultato, i geni di resistenza ai macrolidi *ermA*, *ermB*, *ermC* sembrerebbero insufficienti per lo studio della famacoresistenza alla tilosina dei ceppi di *C. perfringens*.

I ceppi di *C. perfringens* vengono considerati sensibili alla lincomicina per valori di MIC ≤ 1 µg/ml (Martel *et al.*, 2004) e, in base a questo valore, il 71,6% dei ceppi testati si è dimostrato resistente. Questo dato coincide con i risultati ottenuti in Brasile (Silva *et al.*, 2009) ma è sensibilmente superiore rispetto a quelli del Belgio, dove le resistenze hanno riguardato il 43% dei ceppi esaminati (Martel *et al.*, 2004). In uno studio analogo condotto negli USA la resistenza ha caratterizzato il 100% dei ceppi testati con valori di MIC ≥ 8 µg/ml (Watkins *et al.*, 1997).

La bacitracina è una molecola registrata in Italia solo per gli allevamenti cunicoli, ma viene ampiamente utilizzata negli allevamenti avicoli in molti paesi extraeuropei per il trattamento dell'enterite necrotica. Nel presente studio è stata osservata una distribuzione bimodale delle MIC con l'80% dei ceppi che si attesta su valori di MIC inferiori al break point di sensibilità, stabilito secondo Chalmers *et al.* (2008) in 16 µg/ml.

Il presente studio rappresenta il primo report eseguito in Italia sulla farmacosensibilità di *C. perfringens* isolati dal pollo in corso di malattia. La

valutazione periodica della sensibilità di *C. perfringens* potrebbe rappresentare uno strumento per ottimizzare l'efficacia delle terapie dell'enterite necrotica, nell'ottica di un uso prudente e responsabile del farmaco veterinario.

Bibliografia

1. Chalmers G., Martin S.W., Hunter D.B., Prescott J.F., Weber L.J., Boerlin P. 2008. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Veterinary Microbiology*, 127, 116-127.
2. Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistences. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65, 232-260.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, seventh ed. CLSI document M11-A7, vol. 27, No. 2. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
4. Dhillon A. S., Roy P., Lauerman L., Schaberg D., Weber S., Bandli D., Wier F. 2004. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Diseases*, 48:675-680.
5. Giguère S. 2006. Macrolides, azalides and ketolides. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. and Dowling P.M. Eds. Fourth ed. Blackwell Publishing, Ames. Iowa, 191-205.
6. Giguère S. 2006. Lincosamides, pleuromutilins, and streptogramins. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. and Dowling P.M. Eds. Fourth ed. Blackwell Publishing, Ames. Iowa, 2006, 179-190.
7. Jae-Hyuk J., Yoon Eun-Jeong, Choi Eung-Chil, Choi Sung-Sook. 2009. Development of taqMan probe-based real-time PCR method for *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, rapid detection of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance genes, from clinical isolates. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(11):1464-9.
8. Johansson A., Greko C., Engström B. E., Karlsson M. 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*, 99:251–257.
9. Keyburn L., Boyce J.D, Vaz P., Bannam T. L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J. I, Moore R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
10. Martel A., Devrise L. A., Cauwerts K., De Gussem K., Decostere A., Haesebrouck F. 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology*, 33(1):3-7.
11. Ng L. K., Martin I., Alfa M., Mulvey M. 2001. Multiplex PCR for detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15:209-215.

12. Roberts M. C. 2003. Acquired tetracycline and/or macrolide–lincosamides–streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe*, 9:63-69.
13. Sasaki Y., Yamamoto K., Tamura Y., Takahashi T. 2001. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology*, 83:61-69.
14. Silva R. O. S., Salvarani F. M., Assis R.A., Martins N. R. S., Pires P. S., Lobato, F. C. F. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:262-264.
15. Van Immerseel F., Rood J. I., Moore R. J., Titbal R. W. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in Microbiology* 17(1):32-36.
16. Watkins K. L., Shryock T. R., Dearth R. N., Saif Y. M. 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology*, 54:195-200.

Grafico 1. Distribuzione delle MIC della tilosina.

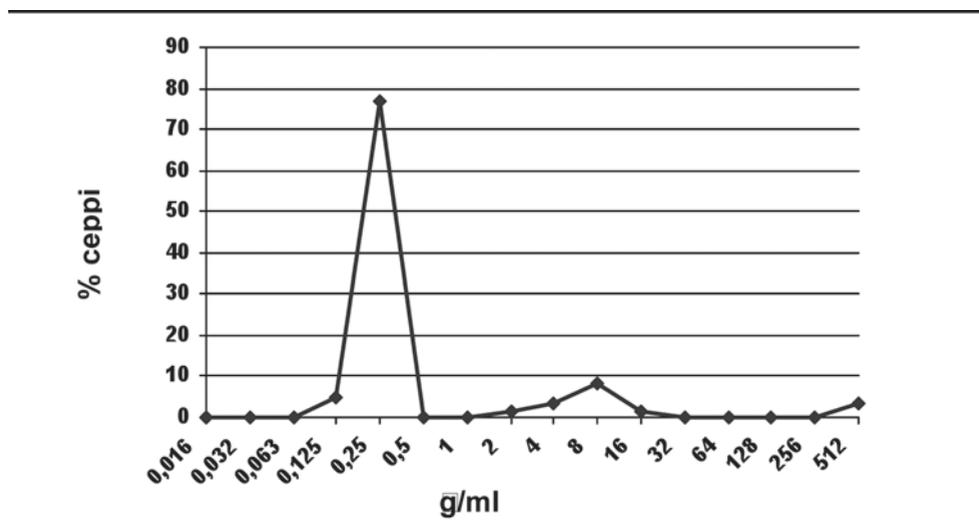


Tabella 1. Distribuzione delle minime concentrazioni inibenti, MIC₃₀ e MIC₉₀ dei sei principi attivi testati nei confronti di 60 ceppi di *C. perfringens* isolati da pollo.

	MIC	(µg/ml)	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC50	MIC90
Tiamulina					16	7	10	21	6								1		2
Amoxicillina	41	17	1															0,016	0,032
Tilosina			3		46			1	2	5	1						2	0,25	8
Bacitracina						2	13	31	2				5	7				2	128
Lincomicina			14		2		1	9	13	6	7			4	4			4	128
Tetraciclina			2		2				6	21	21	8						8	32

Tabella 2. Confronto tra le medie geometriche delle MIC ottenute dai ceppi testati e le MIC dei ceppi di riferimento testati.

	Tiamulina	Amoxicillina	Tilosina	Zinco-bacitracina	Lincomicina	Tetraciclina
<i>C. difficile</i> ATCC 700057	4-8	1	0,125-0,25	128-256	8	64
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	1	16	0,25-0,5	512	4	0,5
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	0,5	0,016	0,25	2	0,25	0,125-0,5
media geometrica delle MIC dei ceppi testati	0,93	0,021	0,45	3,65	3,00	8,88