

FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI CLINICI DI *C. PERFRINGENS* ISOLATI DA BROILER, TACCHINI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE

Bano L.¹, Giovanardi D.², Bacchin C.¹, Ferro T.¹, Drigo I.¹, Agnoletti F.¹

¹ IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso

² Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona

*Corresponding Author. Email: lbano@izsvenezie.it, Tel: +39 0422 302 302

Summary

The minimal inhibitory concentration (MIC) of five antimicrobial agents (phenoxymethylpenicillin potassium, amoxicillin, tylosin, tiamulin, oxytetracycline) was determined for 130 *C. perfringens* field strains isolated from 2009 to 2012 in 50 meat chicken, 50 meat turkey and 30 layer hen commercial farms. The test system was the standardized agar dilution MIC methodology described in the CLSI document M11-A8: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Seventh Edition (February 2012). The lowest MIC 50 and MIC 90 have been recorded for beta-lactamines (penicillin and amoxicillin) even if sporadic resistant strains (3%) with MIC > 0.5 have been detected in broilers and turkeys.

In meat chicken and meat turkey 86% of strains showed MIC values in the range of susceptibility for tylosin (0.125-0.5 µg/ml) but the increase of resistant (≥1 µg/ml) *C. perfringens* sub-populations was observed. Official break points for tiamulin are not available but strains with MIC values lower than 4 µg/ml are conventionally considered susceptible. On the basis of this definition, 86%, 88% and 90% of tested strains isolated from broilers, turkeys and layer hens respectively can be considered susceptible to tiamulin. *C. perfringens* tetracycline resistances are widely distributed in all the poultry categories considered in this paper but with the highest MIC values recorded in turkey where 78% of strains showed MICs ≥ 16 µg/ml.

Periodical reports are necessary to monitor antimicrobial resistances and to promote a more targeted and responsible use of antimicrobials in poultry.

INTRODUZIONE

Il bando dell'utilizzo dei promotori di crescita con attività antimicrobica e delle fonti proteiche di origine animale quali le farine di pesce, ha determinato negli allevamenti avicoli un aumento delle patologie gastroenteriche e in particolare di quelle che vedono implicato *C. perfringens* quali l'enterite necrotica e la disbatteriosi (Ven Immersel *et al.*, 2009). *C. perfringens* è infatti in grado di causare malattia in seguito ad una sua proliferazione nel tubo gastroenterico e alla conseguente produzione di tossine tra le quali la tossina NetB che è stata intimamente associata alla comparsa sia della forma clinica che di quella sub-clinica di enterite necrotica (Keyburn *et al.*, 2008). Il controllo di queste patologie è affidato all'azione di antimicrobici attivi nei confronti di batteri 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 farmaci dovrebbe essere mirato nei confronti del ceppo di *C. perfringens* isolato in corso di malattia e possibilmente caratterizzato per quanto riguarda la presenza di alcuni markers genetici di patogenicità, ma tale approccio non è quasi mai attuabile poiché i tempi d'isolamento e di esecuzione di saggi di farmacosenibilità per gli anaerobi sono incompatibili con la necessità di trattare gli animali rapidamente per evitare pesanti perdite zootecniche.

Nasce quindi l'esigenza di periodici report sull'andamento delle farmacoresistenze di questo microrganismo, possibilmente mirati a testare l'efficacia di principi attivi registrati per le specie target, privilegiando ceppi isolati in corso di malattia. Con il presente studio si è voluto quindi determinare la MIC di alcuni antimicrobici impiegati nel pollame, verso ceppi clinici di *C. perfringens* isolati da broiler, tacchini da carne e galline ovaiole.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Lo studio è stato condotto su 130 ceppi di *C. perfringens* clinicamente rilevanti, isolati tra il 2009 e il 2012 da broiler (50), tacchini da carne (50) e galline ovaiole (30) di allevamenti commerciali del nord Italia. L'isolamento è stato eseguito su terreno non selettivo (agar sangue) incubato in condizioni d'anaerobiosi e i ceppi sono stati conservati a -80 °C in cryo-banks (Nalgene) sino all'esecuzione della prova di farmacosenibilità.

I ceppi di referenza *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285 sono stati inclusi nello studio come controllo.

Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Per la determinazione della MIC è stato utilizzato il metodo della diluizione in agar secondo il protocollo riportato nel manuale CLSI M11-A8 (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standard, Seventh Edition, febbraio 2012). I principi attivi esaminati sono stati: penicillina V (phenoxymethylpenicillinic acid potassium salt, P1382, Sigma-Aldrich), amoxicillina (amoxicilin powder, A8523, Sigma-Aldrich), tilosina (tylosin tatrtrate powder, T6134, Sigma-Aldrich), tiamulina (tiamulin fumarate powder, 46959, Sigma-Aldrich), ossitetraciclina (oxytetracycline hydrochloride, O5875-100G, Sigma-Aldrich). 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 0,016 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.

RISULTATI

La distribuzione delle MIC dei ceppi testati, le MIC₅₀ e le MIC₉₀ sono riportate in tabella 1.

I valori più bassi di MIC sono stati osservati nei confronti dei due beta lattamici testati, in tutte le categorie produttive sottoposte allo studio. Inoltre il 96% dei ceppi isolati da broiler, il 98% di quelli isolati da tacchino e il 100% di quelli isolati da ovaiole si sono collocati al di sotto del valore di MIC di sensibilità fissato a 0,5 µg/ml (CLSI, 2007).

Al contrario i valori maggiori di MIC sono stati rilevati nei confronti dell'ossitetraciclina verso la quale l'88% dei ceppi isolati da broiler, il 98% di quelli isolati da tacchino e l'83,3% di quelli isolati da ovaiole si è dimostrato resistente.

Tutti i ceppi isolati da ovaiole sono risultati sensibili alla tilosina mentre nel tacchino e nel broiler si può osservare una distribuzione bimodale dei ceppi rispetto ai valori di MIC (figura 1). Nella prima sub-popolazione si collocano i ceppi con valori di MIC ≤ 0,5 µg/ml (82% dei ceppi isolati da broiler e l'86% di quelli isolati da tacchino) mentre la seconda sub-popolazione è contenuta in un range compreso tra 2 e 32 µg/ml. Quest'ultimo gruppo di ceppi risulta pertanto separato dal primo da almeno 2 diluizioni e per tale ragione è da ritenersi composto da ceppi resistenti alla tilosina (EUCAST, 2000).

Per la tiamulina non esistono break point ma la distribuzione delle MIC indica chiaramente la presenza di 2 sub-popolazioni, sostanzialmente con la stessa numerosità, distinte da valori di 1 e 2 µg/ml. Tale peculiare distribuzione è stata osservata in ceppi isolati da tutte le 3 tipologie di pollame considerato.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano come i betalattamici siano le molecole che presentano la maggiore efficacia *in vitro* nei confronti di ceppi clinici di *C. perfringens*.

Al contrario l'ossitetraciclina è la molecola verso cui si registra la maggiore percentuale di ceppi resistenti, sia nel pollo che nel tacchino.

La tilosina dimostra un'ottima efficacia nei confronti di ceppi di *C. perfringens* isolati da ovaiole, categoria per la quale tale molecola è registrata in Italia ed ampiamente utilizzata soprattutto in virtù della sua efficacia nei confronti dei micoplasmi. Tuttavia, nonostante la maggior parte dei ceppi isolati da polli e tacchini da carne risultino sensibili a tale principio attivo, si osserva l'insorgenza di sub-popolazioni resistenti in entrambi queste 2 categorie produttive.

La tiamulina è una molecola scarsamente utilizzata nell'allevamento del pollo da carne a causa della sua incompatibilità con alcuni ionofori impiegati comunemente per il contenimento della coccidiosi. Questa molecola potrebbe trovare spazio in quegli allevamenti di broiler dove è scelto un approccio vaccinale nei confronti della coccidiosi, o nella terapia delle forme gastroenteriche del tacchino e dell'enterite necrotica che sporadicamente si osserva nella gallina ovaiole (Dhillon *et al.*, 2004). Nonostante i valori di MIC tendenzialmente elevati (oltre il 50% di ceppi con MIC ≥ 2), l'efficacia *in vitro* della tiamulina appare incerta a causa della mancanza di break point definiti.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Dhillon A. S., Roy P., Lauerma 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.
3. EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Infect. 6, 503-508.
4. 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.
5. 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.

Tabella 1. Distribuzione delle minime concentrazioni inibenti, MIC₅₀ e MIC₉₀ dei principi attivi testati nei confronti di 130 ceppi di *C. perfringens* isolati da broiler (B), tacchino da carene (T), gallina ovaiola (O).

	MIC	(µg/ml)															MIC ₅₀	MIC ₉₀
	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
Penicillina V																		
B	0	0	3	24	18	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,25
T	0	0	2	26	19	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,25
O	0	0	0	16	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,5
Amoxicillina																		
B	1	21	11	15	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
T	1	18	21	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
O	0	0	0	16	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
Tilosina																		
B	0	0	0	2	37	4	0	1	1	2	2	1	0	0	0	0	0,25	4
T	0	0	0	0	39	4	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0,25	16
O	0	0	0	2	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25
Tiamulina																		
B	0	0	0	0	3	14	3	8	15	5	2	0	0	0	0	0	2	8
T	0	0	0	0	5	22	3	3	20	2	0	0	0	0	0	0	1	4
O	0	0	0	0	0	12	1	3	11	2	1	0	0	0	0	0	2	4
Ossitetraciclina																		
B	0	0	0	0	0	2	4	0	2	9	12	19	2	0	0	0	16	32
T	0	0	0	0	0	0	1	3	2	5	9	12	15	3	0	0	32	64
O	0	0	0	0	0	3	2	0	2	7	8	7	1	0	0	0	16	32

Figura 1. Distribuzione dei ceppi rispetto ai valori di MIC della tilosina.

