

## **SINERGIA TRA ANTIBIOTICI CONVENZIONALI E ANTIMICROBICI NATURALI CONTRO *ESCHERICHIA COLI*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ED *ENTEROCOCCUS CECORUM***

Giovangoni G.<sup>1</sup>, Tugnoli B.<sup>2</sup>, Piva A.<sup>1,2</sup>, Grilli E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO), Italy

<sup>2</sup> Vetagro S.p.A., via Porro, 2 - 42124 - Reggio Emilia (Italy)

<sup>3</sup> Vetagro, Inc., 230 S. Clark St., # 320, 60604 Chicago (IL), USA

### **Summary**

Since antibiotic resistance has become an important global issue, it is necessary to find adjuvant molecules with the aim to increase antibiotics efficacy against developing resistant bacteria. In this context, it may be interesting to use antimicrobial compounds, such as organic acids and botanicals, commonly used as feed additives and known for their antimicrobial properties.

Aim of this study was to evaluate the susceptibility of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus cecorum*, three major poultry pathogens responsible for colibacillosis, necrotic enteritis and bacterial chondronecrosis with osteomyelitis respectively, against both antibiotics and antimicrobial compounds. For this purpose, the inhibitory activity of some conventional antibiotics and antimicrobial compounds, such as organic acids and botanicals, against several field strains of *E. coli*, *C. perfringens*, and *E. cecorum* was assessed through the Minimal Inhibitory Concentration test. After the first screening, combinations of selected antibiotics and organic acids or botanicals were tested in order to evaluate whether antibiotics efficacy could be increased by the synergy with alternative antimicrobials.

The results showed that antibiotic resistance varied among the bacteria species, but also a marked strain-specific variability of resistance patterns was observed. On the contrary, the antimicrobial effect of organic acids and botanicals was not species-specific, moreover it was observed that these substances were always effective with a dose-dependent effect, even when antibiotics failed.

In several strains selected combinations of antibiotics and organic acids or botanicals were able to increase bacterial sensitivity to antibiotics.

Organic acids and botanicals may therefore be a valid solution to the issue of antibiotic resistance, because their inclusion in the diet as feed additives can really increase *E. coli*, *C. perfringens*, and *E. cecorum* sensitivity to conventional antibiotics.

### **INTRODUZIONE**

La colibacillosi, l'enterite necrotica e la spondilite enterococcica, anche detta condronecrosi con osteomielite batterica (BCO), sono tre patologie che causano importanti riduzioni delle performance di crescita e notevoli perdite economiche nell'allevamento avicolo. La colibacillosi trasmessa da ceppi patogeni aviari di *Escherichia coli* (APEC) è la principale causa di morbilità e mortalità nel pollo (1). Sebbene esistano diversi patotipi, tra cui alcune forme extraintestinali, la forma più comune è quella intestinale (2). Gli animali infetti si mostrano letargici, possono essere soggetti a problemi respiratori e, nei casi più gravi, ad episodi diarroici

debilitanti (3).

L'enterite necrotica, causata da *Clostridium perfringens* e spesso associata a problemi di coccidiosi in allevamento, è caratterizzata da necrosi ed infiammazione del tratto gastrointestinale. La forma subclinica è la più critica per l'industria avicola, determinando un alto tasso di mortalità e drastici cali di produttività (4).

*Enterococcus cecorum* è un componente del microbiota intestinale di diversi mammiferi e volatili. È stato recentemente riconosciuto come patogeno emergente a livello globale ed agente eziologico della BCO (5), provocando necrosi del tessuto cartilagineo ed infiammazione di osso e midollo osseo in diversi siti di lesione suscettibili al rapido accrescimento che contraddistinguono i polli da carne, tra cui la vertebra T4 e la testa di femore e tibia. Sebbene la patogenesi non sia ancora chiara, si ipotizza che ceppi patogeni traslochino dall'intestino al circolo sanguigno, raggiungendo i siti di lesione sopracitati e colonizzandoli (6,7).

Diverse sono le resistenze ad antibiotici convenzionali riportate in letteratura per quanto riguarda queste specie batteriche. L'antibiotico-resistenza è un tema di rilevanza globale, attualmente critico anche nell'ambito dell'allevamento avicolo. Ad oggi è essenziale ricercare molecole, alternative o adiuvanti l'azione degli antibiotici, al fine di evitare un ulteriore declino nell'efficacia dell'azione di questi farmaci: una soluzione a questo problema potrebbe essere l'utilizzo di acidi organici (OA) e composti naturali identici (NIC) in sostituzione o in associazione agli antibiotici.

## **MATERIALI E METODI**

### *Ceppi batterici*

I ceppi di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum* sono stati isolati da allevamenti italiani di polli da carne: nel dettaglio, sono stati isolati 8 ceppi di *E. coli* da fegato, 10 ceppi di *C. perfringens* da intestino, e 10 ceppi di *E. cecorum*, di cui 4 isolati da intestino, 4 da testa del femore, e 2 da colonna vertebrale. I batteri sono stati identificati con appositi kit e coltivati in infuso cuore e cervello (BHI) a 37°C, in aerobiosi o anaerobiosi a seconda delle condizioni di crescita.

### *Test antimicrobici*

Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di diverse sostanze è stato determinato con test di microdiluzione in piastre 96-well, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione con l'utilizzo di uno spettrofotometro.

Innanzitutto, 9 antibiotici (amoxicillina, ampicillina, bacitracina, doxiciclina, lincomicina, neomicina, penicillina G, tiamulina, tilosina), 8 acidi organici (OA1 – OA8) e 4 composti naturali identici (NIC1 – NIC4) sono stati testati da soli rispetto ai ceppi presi in esame. In base ai risultati di questi screening preliminari, combinazioni di antibiotici ed acidi organici o composti naturali identici sono state selezionate al fine di valutare un'eventuale sinergia tra il farmaco e le molecole antimicrobiche.

## **RISULTATI**

### *Antibiotici*

I pattern di resistenza agli antibiotici testati sono presentati nella Tabella 1.

	<i>E. coli</i> (n = 8)	<i>C. perfringens</i> (n = 10)	<i>E. cecorum</i> (n = 10)
AMX	8	10	10
BAC	NT	8 2	3 7
LIN	8	6 1 1 2	6 1 3
PEN	8	10	10
	NT		
TYL	NT	1 2 1 2 2 2	6 2 2

**Tabella 1:** Frequenza delle concentrazioni minime inibitorie in mg/L degli antibiotici testati contro i ceppi di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum*

AMX = amoxicillina; AMP = ampicillina; BAC = bacitracina; DOX = doxiciclina; LIN = lincomicina; NEO = neomicina; PEN = penicillina G; TIA = tiamulina; TYL = tilosina NT = non testato

Gli 8 ceppi di *E. coli* hanno mostrato un'inequivocabile resistenza alla maggior parte degli antibiotici testati, fatta esclusione per la doxiciclina, per la quale la risposta è stata abbastanza eterogenea. Le due specie Gram positive (*C. perfringens* e *E. cecorum*) sono invece risultate sensibili al gruppo delle penicilline (amoxicillina, ampicillina e penicillina G), e resistenti alla neomicina. Per diversi antibiotici è stata osservata una distribuzione bimodale dei valori MIC: in particolare, per *C. perfringens* nei confronti di lincomicina, tilosina e tiamulina, e per *E. cecorum* nei confronti di lincomicina e tilosina. I ceppi di entrambe le specie sono risultati sensibili a bacitracina e doxiciclina, mentre solo quelli di *E. cecorum* sono risultati sensibili alla tiamulina.

#### *Antibiotici + OA/NIC*

OA1, OA2, OA3, NIC1, NIC2 e NIC3 sono stati testati in combinazione con amoxicillina (64, 32, 16 mg/L) e neomicina (32, 16, 8 mg/L) contro *E. coli*. NIC1 (50% della MIC) ha permesso di migliorare l'azione di neomicina fino alla concentrazione più bassa testata nei ceppi di *E. coli*, mentre l'attività della amoxicillina è risultata invariata.

OA1, OA4, NIC1, NIC3 e NIC4 sono stati testati in combinazione con bacitracina (1, 0.75, 0.5 mg/L) e lincomicina (64, 32, 16 mg/L) contro *C. perfringens*. Nei 6 ceppi risultati resistenti alla lincomicina, grazie a NIC3 (75% della MIC), l'antibiotico ha riacquisito completa efficacia fino a 16 mg/L. NIC1 (37.5% della MIC) e NIC3 (37.5% della MIC) hanno invece aumentato l'azione di concentrazioni di bacitracina inferiori alla MIC.

OA1, OA2, OA4, OA5, NIC1, NIC2, NIC3 e NIC4 sono stati testati in combinazione con lincomicina, neomicina e tilosina (64, 32, 16 mg/L) contro *E. cecorum*. Mentre l'azione di lincomicina e tilosina è risultata pressoché inalterata dall'aggiunta di acidi organici e composti naturali identici, OA5 (50% della MIC) ha riattivato l'azione della neomicina fino a 32 mg/L.

## **DISCUSSIONE**

In generale, sono state osservate numerose resistenze rispetto agli antibiotici testati in questo studio. La risposta dei ceppi nei confronti di alcuni antibiotici, come lincomicina e tilosina, è stata molto variabile: la bimodalità nella frequenza dei valori MIC è riportato in letteratura come risultato dell'emergenza e della diffusione della resistenza agli antibiotici (8).

Gli antibiotici da testare in combinazione con OA e NIC sono stati selezionati in base ai pattern di resistenza osservati in questo studio ed in letteratura, oltretutto in base al loro utilizzo nel trattamento di queste patologie.

È stato già dimostrato che i NIC permettano l'elusione di diversi meccanismi di resistenza batterici nei confronti degli antibiotici. In primo luogo, è noto come questi composti favoriscano l'ingresso di OA all'interno della cellula batterica grazie alla formazione di pori sulla membrana, producendo un'azione antibatterica sinergica (9). Lo stesso meccanismo potrebbe avvenire con gli antibiotici, facilitandone l'entrata. Inoltre, i NIC hanno la capacità di inibire l'estrusione dei farmaci dalla cellula, andando ad inibire le pompe di membrana (10,11).

Il ruolo degli OA nel migliorare l'azione degli antibiotici è meno chiaro, sebbene possa esserci una correlazione con l'azione antimicrobica di queste molecole:

dissociandosi all'interno della cellula, in primo luogo acidificano il pH provocando il consumo di energia batterica nel tentativo di estrarre gli ioni H<sup>+</sup>, inoltre danneggiano la replicazione del DNA grazie all'azione tossica dell'anione (12,13).

### CONCLUSIONI

In questo studio diverse combinazioni di acidi organici e composti naturali identici hanno permesso il miglioramento dell'azione di diversi antibiotici rispetto a ceppi di campo di *E. coli*, *C. perfringens* ed *E. cecorum*. Si può quindi dedurre come queste molecole, utilizzate come alternativa o in supporto agli antibiotici, possano essere un valido espediente per combattere il fenomeno dell'antibiotico resistenza in avicoltura, andando anche a diminuire i rischi per il consumatore.

### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dr. Messina per avere fornito i ceppi utilizzati in questo studio.

### BIBLIOGRAFIA

1. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci.* 2017;4:126.
2. Morabito S. Pathogenic Escherichia coli. Caister Academic Press; 2014. 316 p.
3. Geetha M. Avian Colibacillosis - A Mini Review. *Int J Pure Appl Biosci.* 2018 Feb 28;6:376–80.
4. M'Sadeq SA, Wu S, Swick RA, Choct M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim Nutr.* 2015 Mar 1;1(1):1–11.
5. Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Czopowicz M, Szeleszczuk P. Characterization of pathogenic Enterococcus cecorum from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLoS ONE.* 2017 Sep 21;12(9).
6. McNamee PT, Smyth JA. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. *Avian Pathol J WVPA.* 2000 Aug;29(4):253–70.
7. Wideman RF. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poult Sci.* 2016 Feb 1;95(2):325–44.
8. Temime L, Boëlle PY, Courvalin P, Guillemot D. Bacterial resistance to penicillin G by decreased affinity of penicillin-binding proteins: a mathematical model. *Emerg Infect Dis.* 2003 Apr;9(4):411–7.
9. Grilli E, Piva A. Organic acids and their role in reducing foodborne pathogens in food animals. NOVA Science Publishers; 2012.
10. Miladi H, Zmantar T, Chaabouni Y, Fedhila K, Bakhrouf A, Mahdouani K, et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against foodborne pathogens. *Microb Pathog.* 2016 Oct;99:95–100.
11. Karumathil DP, Nair MS, Gaffney J, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Trans-Cinnamaldehyde and Eugenol Increase Acinetobacter baumannii Sensitivity to Beta-Lactam Antibiotics. *Front Microbiol.* 2018 May 23;9.
12. Bearson S, Bearson B, Foster JW. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Feb 15;147(2):173–80.
13. Cetin-Karaca H. Evaluation of Natural Antimicrobial Phenolic Compounds Against Foodborne Pathogens. Paper. 2011 Jan 1;