



## **Sensibilità agli antimicrobici del *Clostridium perfringens* isolato da bovini con sintomatologia riferibile a clostridiosi - Susceptibility to *Clostridium perfringens* antimicrobial agents, isolated from cattle with clostridial symptoms.**

*Massacci F. R., Cucco L., Forti K., D'Avino N., Tentellini M., Papa P., Magistrali C. F.*

**Abstract.** *Clostridium perfringens* is a leading agent causing enteritis in cattle and other ruminants. The objective of this study was to collect data on antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* isolates from outbreaks of enteritis in cattle. 45 strains of *C. perfringens* type A (23) and A  $\beta$ -2 (22) were tested, using a minimal inhibitory concentration (MIC) method. The data showed a good susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials; nevertheless, a not negligible proportion of isolates was resistant to tetracycline and clindamicin (64% and 33%, respectively). This phenomenon could be linked to the widespread use of tetracycline and tylosin in the bovine production chain.

**Riassunto.** *Clostridium perfringens* è un agente frequente di enterotossiemia nel bovino e nei ruminanti in genere. Scopo di questo lavoro è quello di raccogliere dati sulla sensibilità agli antimicrobici di stipiti di *C. perfringens* isolati da bovino. Sono stati esaminati 45 ceppi di *C. perfringens* tipo A (23) e A  $\beta$ -2 (22) da altrettanti casi di enterotossiemia, tramite determinazione della minima concentrazione inibente (MIC). I valori di sensibilità agli antimicrobici degli stipiti di *C. perfringens* isolati da bovino non si sono dimostrati preoccupanti. Tuttavia, si è registrata una percentuale del 64% e del 33% di ceppi non sensibili, rispettivamente, alle tetracicline e alla clindamicina, antibiotici appartenenti a classi molto utilizzate negli animali da reddito.

### **Introduzione**

*Clostridium perfringens* è un batterio anaerobio, Gram positivo, a forma bastoncellare presente come naturale componente del tratto intestinale dei mammiferi (Lebrun, 2010). Venne chiamato inizialmente *Bacterium welchii* e *Clostridium welchii* in onore di William Henry Welch, che fu il primo a descriverlo nel 1892. La specie prese, poi, il nome di *Clostridium perfringens*, proposto da Veillon e Zuber (1898), sostituendo welchii nella prima edizione di Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey, 1939). I ceppi di *C. perfringens* sono tradizionalmente classificati in 5 tossinotipi (A,B,C, D e E) in base della produzione di 1 o più delle 4 maggiori tossine chiamate  $\alpha$  (cpa),  $\beta$  (cpb),  $\epsilon$  (etx) e  $\iota$  (iap) (Uzal, 2011). Questi 5 tipi sono, inoltre, in grado di produrre ulteriori tossine minori tra cui: l'enterotossina (codificata dal gene cpe) e la tossina  $\beta$ -2 (codificata dal gene cpb2) (Lebrun, 2010). La presenza di tali tossine sembra aggravare le lesioni gastroenteriche negli animali. Nella tabella 1 sono riportati i tossinotipi e le relative tossine riscontrate nei bovini.

Tabella 1: Tossinotipi di <i>Clostridium perfringens</i> isolati da bovino.					
Tossina	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D	Tipo E
$\alpha$	X	X	X	X	X
$\beta$		X	X		
$\epsilon$		X		X	
$\iota$					X
Enterotoss.	(x)				(x)
$\beta$ -2	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)

X: Classica ; (x): Potenziale

Table 1: Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from bovine

Nell'ambito della produzione primaria, le patologie legate ad infezioni da germi anaerobi sono frequenti e causa di rilevanti perdite economiche. Nel bovino e nei ruminanti in genere, prevalgono le enterotossiemie causate da *Clostridium perfringens*, seguito da *Clostridium sordellii* che rappresentano ancora oggi una malattia di notevole impatto negli allevamenti italiani.

In una ricerca precedente, effettuata presso il nostro Istituto, è stata dimostrata la presenza dei tossinotipi A, C e D nel territorio Umbro-Marchigiano, da campioni provenienti da diverse specie animali; in particolare il tipo A  $\beta$ -2 positivo è stato associato a casi di particolare gravità nei ruminanti, nei lagomorfi e nel suino (Forti, 2007). I trattamenti antibiotici non sono efficaci nel controllo delle tossinfezioni da *C. perfringens* nei ruminanti, vengono comunque utilizzati ampiamente per il controllo di infezioni concomitanti e questo sottopone tali agenti patogeni a una costante pressione selettiva. Prescott (2000) riferisce, come antimicrobico per le enterotossiemie nei bovini causate da *C. perfringens*, l'utilizzo di penicillina. Scopo di questa ricerca è stato, dunque, trovare un metodo per la determinazione della minima concentrazione inibente di *C. perfringens*, al fine di essere a conoscenza della sensibilità agli antimicrobici di questo patogeno.

### Materiali e metodi

È stato messo a punto un test, in micrometodo, per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici di *C. perfringens*.

Attraverso il test è stata valutata la MIC in ceppi di *C. perfringens* di diversa provenienza presenti nella ceppoteca batterica, previa una valutazione della presenza di geni codificanti per le principali tossine. Il test sulla valutazione della sensibilità agli antimicrobici di *Clostridium perfringens* si basa sulle indicazioni del CLSI (NCCLS) per la valutazione della sensibilità di germi anaerobi (CLSI M11-A6).

Sono stati sottoposti a determinazione della MIC i ceppi di *C. perfringens* isolati da bovino. Ciascun isolato è stato seminato su una piastra di agar sangue al 5% globuli rossi di montone e incubato per 24-48 ore a 37°C in anaerobiosi. Successivamente, è stata allestita una sospensione in Mueller-Hinton Broth corrispondente ad una concentrazione di circa 107ufc/ml e 0,1 mL di questa sospensione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto di una piastra

di Sensititre Anaerobe MIC Susceptibility Plates (Trek diagnostic Systems, UK) e incubate a 37°C per 46-48 ore in anaerobiosi.

Un ceppo di *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) è stato impiegato come controllo. Gli antimicrobici e le relative concentrazioni testate sono state le seguenti:

Amoxicillina+ acido clavulanico: 0.5/0.25 µg /ml; 1/0.5 µg /ml; 2/1µg /ml; 4/2 µg /ml; 8/4 µg/ml; 16/8 µg/ml;

Ampicillina: 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml; 16 µg /ml;

Ampicillina/sulbactam: 0.5/0.25 µg /ml; 1/0.5 µg /ml; 2/1µg /ml; 4/2 µg /ml; 8/4 µg /ml; 16/8 µg/ml;

Cefotenan: 4 µg /ml; 8 µg /ml; 16 µg /ml; 32 µg /ml; 64 µg /ml;

Cefoxitina: 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml; 16 µg /ml; 32 µg /ml;

Clindamicina: 0.25 µg /ml; 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml;

Cloramfenicolo: 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml; 16 µg /ml; 32 µg/ml; 64 µg/ml;

Imipenem: 0.125 µg /ml; 0.25 µg /ml; 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml;

Meropenem: 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml;

Metronidazolo: 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml; 16 µg /ml;

Mezlocillina: 8 µg /ml; 16 µg /ml; 32 µg /ml; 64 µg/ml; 128 µg /ml;

Penicillina: 0.063 µg/ml; 0,125µg /ml; 0.25 µg /ml; 0,5 µg /ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml;

Piperacillina: 4 µg/ml; 8 µg/ml; 16 µg /ml; 32 µg/ml; 64 µg/ml; 128 µg/ml;

Piperacillina/tazobactam: 0.25/4 µg /ml; 0.5/4 µg /ml; 1/4 µg /ml; 2/4 µg /ml; 8/4 µg /ml; 16/4 µg /ml;

Tetraciclina: 0.25 µg /ml; 0,5 µg/ml; 1 µg /ml; 2 µg /ml; 4 µg /ml; 8 µg /ml.

La lettura è avvenuta tramite visore ottico; la minima concentrazione inibente è stata definita sulla base della diluizione di antimicrobico più bassa in grado di inibire la crescita batterica. Esami di PCR multiplex hanno permesso di individuare i geni (cpa, cpb, etx, iap, cpe e cpb2) che codificano rispettivamente per le 4 principali esotossine prodotte quali  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$  (Giammarioli, 2003) e per ulteriori 2 tossine minori (cpe, cpb2) (Baums, 2004).

## Risultati

Sono stati sottoposti al test 45 stipiti di questo batterio, derivanti da bovini con sintomatologia riferibile a clostridiosi. Mediante PCR ventitré di questi stipiti si sono dimostrati appartenere al tipo A, mentre ventidue erano A  $\beta$ -2. I risultati della MIC sono indicati in tabella 2.

**Tabella 2: valori di minima concentrazione inibente dei ceppi di *Clostridium perfringens*: è indicato il numero di ceppi che presentava quel determinato valore di MIC**

µg/mL	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Amoxicillina+ac. clav				43		1	1				
Ampicillina				42	1		2				
Ampicillina/sulbactam				43		1	1				
Cefotetan							44	1			
Cefoxitina					23	19	2	1			
Clindamicina			14	3	2	12	5	9			
Cloramfenicolo						13	26	2	1	1	2
Imipenem		11	24	7	2		1				
Meropenem				45							
Metronidazolo				4	2	24	6	2	1		
Mezlocillina							43	2			
Penicillina	12	21	7	4			1				
Piperacillina							44	1			
Piperacillina/tazobactam			32	5	3	3	2				
Tetraciclina			7			1	8	29			

Table 2: Values of minimum inhibitory concentration of *Clostridium perfringens* strains: the number of strains that had that particular value of MIC, is indicated

Per la valutazione dei risultati delle varie MIC sono stati impiegati i break-point interpretativi indicati per i batteri anaerobi dalle norme CLSI (CLSI- ex NCCLS M11-A6). Sulla base di questi break-point, i valori di MIC riscontrati si sono collocati nel range della sensibilità per la maggior parte degli antimicrobici.

In particolare, non si sono registrati ceppi resistenti né intermedi per: cefotetan; cefoxitina; imipenem; meropenem; mezlocillina; piperacillina; piperacillina/ tazobactam. Per quanto riguarda i dati relativi alla ampicillina, tre ceppi si sono dimostrati non sensibili; di questi uno presentava anche una MIC elevata per penicillina, classificata come resistente.

Si tratta dell'unico ceppo non sensibile alla penicillina, ed era produttore di tossina  $\beta$ -2.

Due ceppi si sono rivelati non sensibili sia per amoxicillina+ acido clavulanico che per ampicillina/ sulbactam.

Uno stipite è risultato intermedio al metronidazolo. Per cloramfenicolo, sulla base dei break-point indicati dal CLSI, è stato possibile individuare un ceppo intermedio e tre resistenti, mentre per clindamicina, cinque ceppi si sono dimostrati intermedi e nove resistenti.

Infine per la tetraciclina ventinove ceppi hanno mostrato una MIC non sensibile (8 µg/ml), pari alla massima concentrazione testata nel corso del presente lavoro.

Nove dei ceppi risultati non sensibili alla tetraciclina, sono risultati resistenti anche alla clindamicina, (vedi Tabella 3).

Tabella 3: categorie interpretative dei ceppi di <i>Clostridium perfringens</i>			
ANTIMICROBICO	SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Amoxicillina+ ac. clavulamico	43	1	1
Ampicillina	42	1	2
Ampicillina/sulbactam	43	1	1
Cefotetan	45		
Cefoxitina	45		
Clindamicina	31	5	9
Cloramfenicolo	41	1	3
Imipenem	45		
Meropenem	45		
Metronidazolo	44	1	
Mezlocillin	45		
Penicillina	44		1
Piperacillina	45		
Piperacillina/tazobactam	45		
Tetraciclina	16	29	(n.t.)
(n. t.) : concentrazione $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ non testata nel presente lavoro			

Table 3: Categories of strain sensitivity for *Clostridium perfringens*

## Discussione

I valori di sensibilità agli antimicrobici degli stipiti di *C. perfringens* isolati da bovino non si sono dimostrati preoccupanti; è noto tuttavia che questa specie microbica sia generalmente sensibile agli antibiotici (Goldstein, 2011). Nonostante ciò, si è registrata una certa percentuale di ceppi non sensibili ad alcuni antibiotici appartenenti a classi molto utilizzate negli animali da reddito.

Nell'ambito dei beta-lattamici, in un quadro generalmente favorevole, si è osservata la presenza di alcuni stipiti intermedi o resistenti alla ampicillina e alla penicillina. Più importanti i dati di resistenza riscontrati in altre classi di antibiotici, in particolare, le tetracicline e la clindamicina.

In molti casi questa resistenza è risultata associata. Questo dato è giustificato dal largo impiego di questi antibiotici nelle specie da reddito, ed è stata rilevata da altri autori: ad esempio Slavic' (2011) ha descritto una percentuale del 57.5% di stipiti di *C. perfringens* da bovino resistenti alle tetracicline.

Per quanto riguarda la clindamicina, questo antibiotico fa parte della classe macrolidi-lincosamidi-streptogramine (MLS), la stessa a cui appartiene anche la tilosina, un farmaco molto utilizzato in medicina veterinaria. Gli antibiotici appartenenti a questa classe presentano

fenomeni di resistenza crociata legati alla presenza di un gene *erm*. È possibile ipotizzare che la resistenza alla clindamicina riscontrata nel corso del presente lavoro sia legata quindi a questo fenomeno. Dal momento che la pratica di ricercare gli anaerobi non è diffusa nei laboratori di medicina umana e veterinaria, e i test di valutazione della sensibilità agli antimicrobici sono raramente applicati in modo sistematico, i profili di resistenza di questa categoria di batteri spesso non sono disponibili o lo sono solo in modo parziale (Goldstein, 2011).

Questa lacuna ostacola la corretta applicazione delle terapie negli animali domestici e non permette di monitorare l'andamento delle resistenze in batteri potenzialmente zoonosici. La possibilità di effettuare delle determinazioni della sensibilità agli antimicrobici di *C. perfringens* permette il monitoraggio della antibiotico resistenza in questa specie, sia a fini di sanità animale che di salute pubblica.

Per quanto riguarda *C. perfringens*, la presenza di resistenze ad alcuni antimicrobici largamente utilizzati nella produzione animale, come tetracicline, induce a ritenere che la pressione selettiva abbia un effetto anche in questa specie batterica. Si suggerisce pertanto un monitoraggio periodico della sensibilità in questa specie, per individuare situazioni potenzialmente a rischio.

## Bibliografia

Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G., Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 100,11-16.

Bergey D.H., Breed R.S., Murray E.D.G., Hitchens A.P. (1939). The genus *Clostridium*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edn. Williams and Wilkins. pp 551-572.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2001). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A6. CLSI, Wayne, Pa.

Forti K., De Giuseppe A., Severi G., Marcaccio S., Menichelli M., Magistrali C., Guglielmi F., Gradi M., Cagiola M. (2007). Caratterizzazione molecolare di *C. perfringens* enterotossigeno nei ruminanti domestici e selvatici. III Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, Abano Terme (PD).

Giammarioli M., Marini C., Severi G., Micci E., Rutili D., Cagiola M. (2003). Tipizzazione molecolare di *Clostridium perfringens* mediante una PCR multiplex. V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Pisa 20-21.

Goldstein, E.J.C., Citron D.M. (2011). Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, Part I. *Clinical microbiology newsletter* 33:1.

Lebrun M, Mainil JG, Linden A, (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record* 167: 13-22.

Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. (2000). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd edn.

Slavic' D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K.C., Zoethout J.K., Weir P.E., Bateman D. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine and turkey origin from Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 75:89-97.

Uzal F.A., McClane B.A. (2011). Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens*

type C infections. *Veterinary Microbiology* 153:37-43.

Veillon A., Zuber A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Archives de Médecine Expérimentale et d'Anatomie Pathologique* 10, 517-545.



*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.*

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>	
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it; redazione-spv@izsum.it <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> ; <a href="http://indice.spv@izsum.it">http://indice.spv@izsum.it</a>	
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	