

Sensibilità alla zinco bacitracina di ceppi di *Clostridium perfringens* isolati da conigli: risultati preliminari

F. Agnoletti¹, C. Bacchin¹, L. Bano¹, A. Guolo¹, A. Passera², M. Favretti², E. Mazzolini²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Viale Brigata Treviso 13/A, 31100 Treviso, Italy; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Udine, Via Della Roggia 100, 33030 Campoformido, Udine, Italy

Corresponding Author: Dr. Fabrizio Agnoletti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Viale Brigata Treviso 13/A, 31100 Treviso, Italy
Tel. +39 0432 302302 - Fax: +39 0432 421154 - E-mail: fagnoletti@izsvenezie.it

ABSTRACT: Antimicrobial susceptibility to zinc bacitracin of *Clostridium perfringens* field strains isolated from rabbits: preliminary results. *The pathogenic role of clostridia in rabbit enteropathies is well known and there are some recent evidences of an involvement of C.perfringens in ERE syndrome. To control the ERE syndrome as well as the clostridiosis the zinc bacitracin is widely used in commercial rabbit farms in Europe. Nevertheless data regarding the in vitro efficacy of zinc bacitracin against clostridia of rabbit origin are not available. In this study the minimal inhibitory concentrations (MICs) of zinc bacitracin were evaluated in n.100 C.perfringens strains isolated from rabbits of Italian fattening units. The agar dilution method was performed in supplemented Brucella Agar as recommended by the NCCLS document M11-A6. Most strains (94%) presented low MIC ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$) values and only some strains (3%) were inhibited by a $1 \mu\text{g/ml}$ concentration. Two isolates (2%) displayed a $16 \mu\text{g/ml}$ MIC value. The MIC values of C.perfringens ATCC reference strains presented a good accordance between each batch. The presence of two strains with $16 \mu\text{g/ml}$ MIC value and the MICs bimodal distribution of the tested strains pointed out the existence of an acquired resistance against the polypeptide in strains of rabbit origin, nevertheless the MIC₉₀ of $0.5 \mu\text{g/ml}$ achieved in the study emphasized the wide susceptibility to zinc bacitracin of Italian isolates of C.perfringens from rabbits.*

Keywords: *Clostridium perfringens*, Zinc bacitracin, Minimum inhibitory concentration, Rabbit.

INTRODUZIONE – La zincobacitracina è un antibiotico polipeptidico ampiamente utilizzato negli allevamenti di conigli in Europa per la sua efficacia nei confronti dell'enteropatia enzootica del coniglio (ERE); numerosi studi hanno dimostrato che la sua somministrazione nell'alimento o nell'acqua di bevanda limita la mortalità e riduce il peggioramento delle performance zootecniche in corso di patologia enterica (Boisot *et al.*, 2004; Coudert e Licois, 2004; King, 1980). Lo spettro d'azione della zinco bacitracina, specificamente attiva nei confronti dei batteri Gram-positivi, fa sì che questa molecola venga utilizzata per controllare le enterotossiemie del coniglio, prevalentemente sostenute da *C.spiroforme*, *C.piliforme* e *C.perfringens* (Carman e Evans, 1984; Percy *et al.*, 1993). Tuttavia, mentre sono reperibili in letteratura

informazioni in merito alla sensibilità alla zinco bacitracina di ceppi di *C.perfringens* isolati da pollame, suino e bovino (Benning e Mathers, 1999; Dutta *et al.*, 1983; Devriese *et al.*, 1993; Watkins *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 2004), mancano del tutto informazioni relative alla specie cunicola. Obiettivo di questo lavoro è valutare *in vitro* la sensibilità alla zincobacitracina di ceppi di campo di *C.perfringens* isolati dal coniglio.

MATERIALI E METODI – Nel corso del biennio 2003-2004 sono stati raccolti n.100 ceppi di *C.perfringens*, isolati da conigli affetti da sindromi enteriche provenienti da n. 72 allevamenti italiani. *C.perfringens* veniva isolato dal contenuto del cieco mediante semina su Perfringens Agar Base (Oxoid) supplementato con globuli rossi di montone (5% v/v), polimixina B solfato e kanamicina (S.F.P. supplement, Oxoid); le piastre inoculate venivano incubate in condizioni di anaerobiosi a 37°C per 24 h. Gli isolati venivano identificati mediante test biochimici (API 20 A - bioMerieux) e conservati a – 80°C fino al momento dell’effettuazione del test. Per valutare la farmacosensibilità è stata determinata la minima concentrazione inibente (MIC) mediante diluizione in agar, utilizzando il terreno Brucella Agar (Becton Dickinson) secondo le raccomandazioni del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), documento M11-A6. Lo standard di zinco bacitracina è stato solubilizzato come da indicazioni della ditta produttrice (Alpharma AS, Oslo, Norway). La zinco bacitracina è stata incorporata nelle piastre di Brucella Agar in concentrazioni scalari da 0.06 a 256 µg/ml. I ceppi congelati di *C.perfringens* sono stati rivitalizzati in Brucella Agar supplementato. Gli inoculi erano rappresentati da 2 µl di brodocolture di *C.perfringens* in Schladler Anaerobe Broth (Oxoid), standardizzate ad una torbidità equivalente a 0,5 Mc Farland. La lettura veniva effettuata dopo 48 h di incubazione in condizioni di anaerobiosi seguendo i criteri interpretativi dell’NCCLS (2004). Venivano considerati resistenti ceppi con MIC ≥16 µg/ml. La determinazione delle MIC è stata effettuata suddividendo i ceppi batterici in tre lotti; in ciascuno di essi venivano inseriti due ceppi di riferimento di *C.perfringens* (ATCC 3624 e ATCC 3628) per valutare la riproducibilità interna del test.

RISULTATI E CONCLUSIONI – I risultati della determinazione dei valori di MIC dei ceppi di campo sono riportati in tabella 1; il 95% dei ceppi ha presentato MIC ≤ 0,5 µg/ml, il 3% dei ceppi MIC = 1 µg/ml, e solo due ceppi (2%) sono risultati resistenti in quanto presentavano una MIC = 16 µg/ml. Il metodo della diffusione in agar utilizzato per la determinazione dei valori di MIC ha dimostrato un’ottima riproducibilità, come evidenziato in tabella 2; il NCCLS (2004) considera normale una variabilità dei valori di MIC compresa entro ± 1 diluizione. *C.perfringens* ha dimostrato un’elevata sensibilità *in vitro* alla zincobacitracina con una MIC₉₀= 0,5 µg/ml. I valori di MIC da noi ottenuti sono analoghi a quelli ottenuti in altre specie animali da Devriese *et al.* (1993) e Benning e Mathers (1999).

Tabella 1 - Frequenza dei valori di MIC della zinco bacitracina nei confronti di 100 ceppi di campo di *C.perfringens*.

MIC (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
N° strains		4	31	60	3				2				

Tabella 2 – Riproducibilità interna del test: valori di MIC dei ceppi di referenza di *C.perfringens*.

N°ATCC	MIC (µg/ml)												
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
3624			1	2									
3628			1	2									

La distribuzione bimodale dei valori di MIC da noi evidenziata e la presenza di due ceppi con MIC=16 µg/ml, dimostrano l'esistenza di fenomeni di resistenza acquisita nei confronti di questo antibiotico polipeptidico negli allevamenti cunicoli italiani. La dimensione di questo fenomeno, tuttavia, sembra ancora molto contenuta, probabilmente in relazione al fatto che l'utilizzo della zinco bacitracina in Italia è permesso, in via sperimentale, soltanto da due anni.

BIBLIOGRAFIA – **Benning, V.R.**, Mathers, J.J., 1999. Comparison of agar dilution and broth microdilution methods of anaerobic antimicrobial susceptibility testing using several veterinary antibiotics against *Clostridium perfringens* strains originating from porcine and avian sources. *Anaerobe*. 5:561-569. **Boisot, P.**, Duperray, J., Guyonvarch, A., Richard, A., Licois, D., Coudert, P., 2004. Evaluation of the effectiveness of soluble bacitracin (Bacivet S[®]) in drinking water compared to bacitracin in the feed (Albac[®]), during an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome. pp. 457-462 in Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. **Carman, R.J.**, Evans, R.H., 1984. Experimental and spontaneous clostridial enteropathies of laboratory and free living lagomorphs. *Lab. Anim. Sci.* 34:443-452. **Coudert, P.**, Licois, D., 2004. Study of early phenomena during experimental epizootic rabbit enteropathy: preliminary results. pp. 520-525 in Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. **Devriese, L.A.**, Daube, G., Hommez, J., Haesebrouck, F., 1993. *In vitro* susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. *J. Appl. Bacteriol.* 75:55-57. **Dutta, G.N.**, Devriese, L.A., Van Assche, P.F., 1983. Susceptibility of clostridia from farm animals to 21 antimicrobial agents including some used for growth promotion. *J. Antimicrob. Chemother.* 12:347-356. **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. *Vet. Microbiol.* 99:251-257. **King, J.O.L.**, 1980. Effects of feeding zinc bacitracin on the fertility of rabbit does and the development of young rabbits. *Br. Vet. J.* 136:240-244. **National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2004.** Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard - sixth edition. NCCLS Document M11-A6, Vol. 24 N° 2. NCCLS, Wayne, Pa. **Percy, D.H.**, Muckle, C.A., Hampson, R.J., Brash, M.L., 1993. The enteritis complex in domestic rabbits: a field study. *Can. Vet. J.* 34:95-102. **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. *Vet. Microbiol.* 54:195-200.