

RESISTENZA NEI CONFRONTI DI ERITROMICINA E TETRACICLINA IN BATTERI LATTICI ISOLATI DA PECORINI TRADIZIONALI DELLA TOSCANA

Barbara TURCHI^{*}, Filippo FRATINI¹, Fabrizio BERTELLONI¹, Angelo MACCHI²,
Valentina Virginia EBANI¹, Domenico CERRI¹

RIASSUNTO - L'uso indiscriminato di antibiotici come additivi ad azione auxinica o agenti terapeutici nell'alimentazione animale è tra le cause della rapida insorgenza di flore microbiche caratterizzate da resistenze multiple anche trasferibili orizzontalmente. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di antibiotico-resistenze nei confronti di tetraciclina ed eritromicina in batteri lattici isolati da prodotti lattiero-caseari tradizionali toscani. Settantanove ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Lactococcus* sono stati testati al fine di determinare il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC). I criteri adottati per distinguere ceppi resistenti e sensibili sono quelli dichiarati dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) nel 2012. Per il genere *Lactobacillus* è stata osservata una notevole resistenza nei confronti di tetraciclina, soprattutto in *Lactobacillus plantarum* (72,4%). *Lactobacillus paracasei* si è, invece, dimostrato sensibile (69,2%). Nei confronti di eritromicina la suscettibilità del genere *Lactobacillus* è risultata molto elevata (97,5%). Relativamente al genere *Lactococcus* per tetraciclina, si è osservata una prevalenza dei ceppi sensibili (81%) rispetto ai resistenti. Nei confronti di eritromicina si è avuto un comportamento analogo a quello rilevato per il genere *Lactobacillus*, con sensibilità pari al 100%. La resistenza nei confronti di tetraciclina è risultata decisamente superiore sia in *Lactobacillus* spp che in *Lactococcus* spp. Allo stesso tempo una spiccata sensibilità è stata osservata nei confronti di eritromicina. Questo dato potrebbe trovare spiegazione nel largo impiego di tetraciclina in ambito zootecnico effettuato nel corso degli anni. I risultati di questo lavoro evidenziano la presenza di fenotipi resistenti in flore lattiche che possono comunemente ritrovarsi nei prodotti caseari. Sebbene attualmente i batteri lattici non rappresentino la maggiore fonte di antibiotico-resistenza negli alimenti, la presenza anche di pochi ceppi resistenti può comunque rappresentare un pericolo per la salute del consumatore. A questo proposito, la determinazione del valore di MIC rappresenta un valido strumento al fine di individuare i ceppi potenzialmente portatori di geni di resistenza trasferibili.
Parole chiave: antibiotico-resistenza, batteri lattici, minima concentrazione inibente, eritromicina, tetraciclina

SUMMARY - Resistance against tetracycline and erythromycin in lactic acid bacteria isolated from Tuscan traditional dairy products - The use of antibiotics as therapeutic additives or

* Corrispondenza ed estratti: barbara.turchi@for.unipi.it

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie. Università di Pisa. Viale delle Piagge 2, Italia

² Dottore Magistrale in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali, Collaboratore esterno

growth promoters in animal feeding is one of the main cause of the rapid spread of multidrug resistant microorganisms. The aim of the present work was to evaluate the antibiotic resistance against tetracycline and erythromycin in lactic acid bacteria isolated from Tuscan traditional dairy products. Seventy-nine strains belonging to genus *Lactobacillus* and *Lactococcus* were tested to determine their Minimum Inhibitory Concentration values (MIC). Susceptible and resistant strains were determined according to the European Food Safety Authority guidelines (EFSA, 2012). As concern *Lactobacillus* spp we observed a high resistance against tetracycline, especially for the strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum* (72,4%). *Lactobacillus paracasei* showed instead a higher percentage of susceptibility (69,2%). Almost all the *Lactobacillus* strains were also susceptible to erythromycin (97,5%). *Lactococcus* strains demonstrated a different behavior with a prevalence of susceptible strains for both tetracycline (81%) and erythromycin (100%). In general we observed a high overall resistance against tetracycline and a remarkable susceptibility against erythromycin in both tested genus. This could be related to the wide use of tetracycline in animal husbandry as growth promoters, which was a common practice in the past. The use of erythromycin, on the contrary, has always been more therapeutic treatment focused. In conclusion, the results of the present work highlight the presence of resistant phenotypes in lactic acid bacteria strains which can be easily isolated from dairy products. Nowadays lactic acid bacteria are not the main source of antibiotic-resistance in food, however the presence of few resistant strains represent a real a risk for consumers. Thus, the determination of MIC values represents the best tool to identify the strains which could harbour resistance genes located on mobile genetic elements horizontally transmissible among microorganisms. Keywords: antibiotic-resistance, lactic acid bacteria, minimum inhibitory concentration, erythromycin, tetracycline

INTRODUZIONE

I batteri lattici vengono tradizionalmente impiegati per la produzione di un'ampia varietà di alimenti fermentati (formaggi, lattici acidi, burro, prodotti da forno, ecc.). Le specie comunemente impiegate nelle produzioni casearie e per l'industria alimentare vengono raramente riscontrate come causa d'infezioni opportunistiche, tuttavia il rapido sviluppo di microrganismi, appartenenti al gruppo dei batteri lattici, resistenti agli antibiotici comunemente usati in medicina umana e veterinaria è, ad oggi, un problema di grande importanza ed un motivo di preoccupazione per ricercatori e autorità. Questo fenomeno è senza dubbio correlato all'utilizzo di antimicrobici in zootecnia, non solo a fini strettamente terapeutici.

L'uso indiscriminato di antibiotici come additivi a scopo auxinico o agenti terapeutici nell'alimentazione animale, infatti, rappresenta il principale motivo della rapida insor-

genza di flore microbiche caratterizzate da resistenze multiple trasferibili anche orizzontalmente. Sebbene, come precedentemente accennato, raramente i batteri lattici si rendono responsabili di infezioni opportunistiche, è sempre più frequente l'isolamento di ceppi resistenti agli antibiotici di più largo impiego.

Il ruolo dei batteri lattici nella diffusione dell'antibiotico-resistenza risulta fondamentale proprio perché questi microrganismi possono facilmente raggiungere il consumatore attraverso gli alimenti e fungere da anello di congiunzione tra la microflora intestinale animale e umana. Questa connessione diventa ancora più stretta ed immediata se consideriamo le microflore lattiche non-starter, fortemente legate all'ambiente di provenienza, che risentono per prime dei cambiamenti riguardanti tale ambiente e sono soggette alla sola selezione naturale. La presenza di tali microrganismi nei prodotti alimentari, tuttavia, non può essere

controllata e standardizzata, come già avviene per le colture starter.

Un ulteriore aspetto che deve essere considerato è quello relativo alla distinzione tra resistenze intrinseche ed acquisite. La resistenza intrinseca è strettamente correlata ad un genere o ad una specie batterica ed è determinata dall'espressione di geni situati sul cromosoma batterico; la resistenza acquisita è invece molto spesso determinata dalla presenza di geni situati su elementi genetici mobili (plasmidi, trasposoni, integroni) che possono essere trasferiti orizzontalmente da un microorganismo ad un altro attraverso il fenomeno della coniugazione, che non necessariamente coinvolge microrganismi filogeneticamente affini.

Molte ricerche ormai confermano la presenza di resistenze nei batteri lattici, isolati da prodotti alimentari fermentati [1,2].

MATERIALI E METODI

Settantanove ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Lactococcus* isolati da Pecorini Tradizionali della Toscana (Pecorino della Lunigiana, Pecorino delle Colline Senesi, Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli, Pecorino della Montagna Pistoiese) sono stati testati al fine di determi-

nare il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC) nei confronti di tetraciclina ed eritromicina (Tab. 1).

Il protocollo impiegato per tale determinazione è stato quello suggerito da Comunian *et al* (2010) opportunamente modificato [3]. Gli inoculi batterici, allestiti in soluzione fisiologica sterile, sono stati standardizzati mediante metodica McFarland, utilizzando come riferimento il grado di torbidità corrispondente allo 0,5 della scala. Il terreno impiegato per la determinazione della MIC è stato il Lactic acid bacteria Susceptibility Medium (LSM) come suggerito da Klare *et al* (2005) [4]. Per entrambi gli antibiotici sono state testate concentrazioni comprese nel range 0,5 - 256 ppm. Dopo incubazione di 24-48 ore, alle temperature ottimali di crescita dei microrganismi, è stata eseguita la lettura della micropiastra secondo il metodo "a vista" descritto dagli NCCLS (2006) [5].

I valori di cut-off, adottati, per distinguere ceppi resistenti e sensibili, sono stati quelli dichiarati dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) nel 2012 [6]: per tetraciclina 32 ppm (*L. plantarum*) e 4 ppm (*L. casei/paracasei* e *L. lactis*); per eritromicina 1 ppm (*L. plantarum*, *L. casei/paracasei* e *L. lactis*).

Tabella 1 - Provenienza, specie di appartenenza e numero dei ceppi testati
Table 1 - Provenience, species and number of tested strains

Prodotto Product	Specie Species	Numero ceppi Number of strains
Pecorino della Lunigiana	<i>L. plantarum</i>	19
	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	7
Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>L. plantarum</i>	5
	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	5
	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	5
Pecorino delle Colline Senesi	<i>L. plantarum</i>	5
	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	10
	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	1
Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>L. paracasei</i>	13
	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	7
	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	2

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per il genere *Lactobacillus* è stata osservata una notevole resistenza nei confronti di tetraciclina, soprattutto in *Lactobacillus plantarum* (72,4%). *Lactobacillus paracasei* ha mostrato, invece, una maggiore sensibilità (69,2%). E' stato possibile osservare una distribuzione bimodale per quanto concerne la resistenza nei confronti di tetraciclina in entrambe le specie di *Lactobacillus*. Nei confronti di eritromicina, invece, la suscettibilità del genere *Lactobacillus* è risultata essere molto elevata (97,5%) (Fig.1).

Relativamente al genere *Lactococcus* per tetraciclina si è osservata una prevalenza dei ceppi sensibili (81%) rispetto a quelli resistenti. In generale la distribuzione dei valori di MIC dei ceppi è apparsa più omogenea, con sole tre eccezioni rappresentate da tre ceppi di *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* identificabili quali probabili portatori

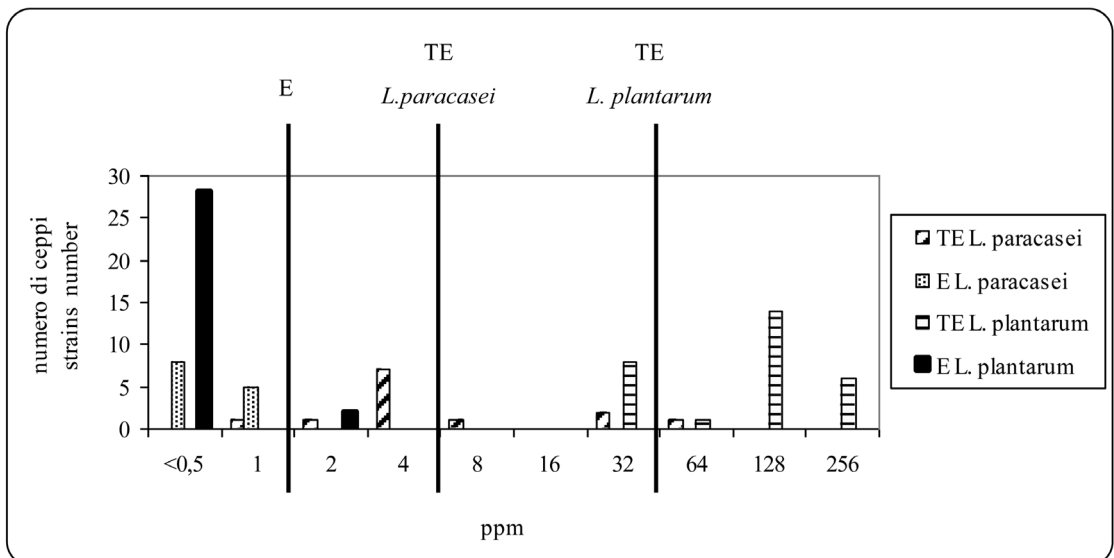
di geni codificanti l'antibiotico-resistenza. Nei confronti di eritromicina si è avuto un comportamento analogo a quello rilevato per il genere *Lactobacillus*, con sensibilità pari al 100% (Fig. 2).

CONCLUSIONI

La resistenza nei confronti di tetraciclina è risultata decisamente superiore sia in *Lactobacillus* spp che in *Lactococcus* spp rispetto a quella evidenziata nei confronti di eritromicina. Questo dato potrebbe trovare spiegazione nel largo impiego che nel corso degli anni è stato fatto della tetraciclina come auxinico in ambito zootecnico. I risultati di questo lavoro evidenziano la presenza di fenotipi resistenti in flore lattiche non-starter che possono comunemente ritrovarsi nei prodotti lattiero-caseari. La presenza nell'ambiente di questi ceppi resistenti costituisce una possibile fonte di contaminazione

Figura 1 - Distribuzione dei valori di MIC in *Lactobacillus* spp. Viene mostrata la distribuzione dei valori di MIC relativi a eritromicina (E) e tetraciclina (TE) in *L. plantarum* e *L. paracasei*. Le linee verticali rappresentano i valori di cut-off per eritromicina (1 ppm) e tetraciclina (4 ppm per *L. paracasei*; 32 ppm per *L. plantarum*)

Figure 1 - MIC values distribution in *Lactobacillus* spp. It is shown the MIC values distribution for erythromycin (E) and tetracycline (TE) in *L. plantarum* and *L. paracasei*. Vertical lines represent cut-off values for erythromycin (1 ppm) and tetracycline (4 ppm for *L. paracasei*; 32 ppm for *L. plantarum*)



dei prodotti caseari lungo tutta la filiera produttiva; in questo contesto i batteri non-starter possono fungere da vettori di resistenze.

Sebbene attualmente i batteri lattici non rappresentino la maggiore fonte di antibiotico-resistenza negli alimenti, la presenza anche di pochi ceppi resistenti può comunque costituire un pericolo per la salute del consumatore. A questo proposito, la determinazione del valore di MIC rappresenta un valido strumento al fine di individuare i ceppi potenzialmente portatori di geni di resistenza trasferibili. Ulteriori approfondimenti po-

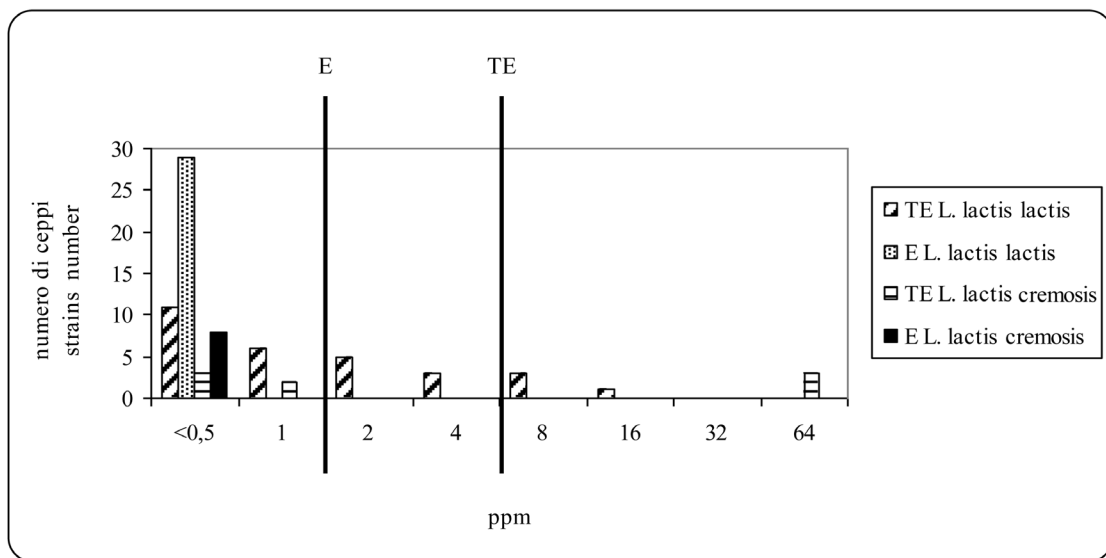
tranno chiarire maggiormente la natura della resistenza osservata nei confronti di tetraciclina; tali indagini saranno volte alla ricerca dei principali determinanti genetici implicati nei fenomeni di resistenza di più frequente riscontro nei batteri lattici (tetW, tetM, tetS, tetL, tetO).

Ringraziamenti:

Poster presentato al 3° Congresso Lattiero-Caseario AITeL-Regione Lombardia, Milano 28 settembre 2012 “Latte e derivati: la ricerca e l’innovazione”.

Figura 2 - Distribuzione dei valori di MIC in *Lactococcus* spp Viene mostrata la distribuzione dei valori di MIC relativi a eritromicina (E) e tetraciclina (TE) in *L. lactis* subsp *lactis* e *L. lactis* subsp *cremoris*. Le linee verticali rappresentano i valori di cut-off per eritromicina (1 ppm) e tetraciclina (4 ppm)

Figure 2 - MIC values distribution in *Lactococcus* spp. It is shown the MIC values distribution for erythromycin (E) and tetracycline (TE) in *L. lactis* subsp *lactis* and *L. lactis* subsp *cremoris*. Vertical lines represent cut-off values for erythromycin (1 ppm) and tetracycline (4 ppm)



BIBLIOGRAFIA

- 1) Salim Ammor M, Florez AB, Mayo B (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 24 559–570
- 2) D’Aimmo MR, Modesto M, Biavati B (2007) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp isolated from dairy and pharmaceutical products. Int J Food Microbiol 115 35-42

- 3) Comunian R, Daga E, Dupré I, Paba A, Devirgiliis C, Piccioni V, Perozzi G, Zonenschain D, Rebecchi A, Morelli L, De Lorentiis A, Giraffa G (2010) Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int J Food Microbiol* 138 151-156
- 4) Klare I, Konstabel C, Müller-Bertling S, Reissbrodt R, Huys G, Vancanneyt M, Swings J, Goossens H, Witte W (2005) Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 12 8982-8986
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-7th ed, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- 6) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 10 (6) 2740-2747