

UN BLEND DI TIMOLO ED ACIDI ORGANICI PUÒ SUPPORTARE L'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ANTIBIOTICI CONVENZIONALI CONTRO *STREPTOCOCCUS SUIS*

A BLEND OF THYMOL AND ORGANIC ACIDS CAN SUPPORT THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CONVENTIONAL ANTIBIOTICS AGAINST *STREPTOCOCCUS SUIS*

GIOVAGNONI G.¹, TUGNOLI B.², PIVA A.^{1,2}, GRILLI E.^{1,3}

¹ DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,
Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

² Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia;

³ Vetagro Inc., 17 East Monroe Street, Suite #179, Chicago, IL 60603, USA

Parole chiave: *Streptococcus suis*, composti bioattivi, additivi per mangimi

Keywords: *Streptococcus suis*, bioactive compounds, feed additives

RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio è stato valutare l'attività antimicrobica di antibiotici convenzionali, acidi organici e composti naturali identici contro cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* e, in secondo luogo, verificare se la combinazione di queste sostanze potesse supportare l'azione di antibiotici non efficaci contro uno dei sierotipi più diffusi a livello globale. È stato innanzitutto eseguito un test di minima concentrazione inibente (MIC) in microdiluizione seguendo le direttive del CLSI. Tetraciclina, neomicina, tilosina e tiamulina sono risultati gli antibiotici con pattern di sensibilità variabili e valori MIC più elevati. Tra gli acidi organici e composti naturali identici testati, acido citrico, acido dodecanoico e timolo hanno avuto l'effetto inibitorio più marcato. Pertanto questi composti sono stati combinati al fine di realizzare un prototipo, utilizzato per aumentare l'efficacia degli antibiotici sopracitati. La combinazione è stata testata contro il ceppo 703 (sierotipo 2) ed ha permesso di supportare l'azione dei quattro gli antibiotici convenzionali, inibendo complessivamente la crescita batterica tra il 74 ed il 92%. La miscela di acido citrico, acido dodecanoico e timolo può essere quindi utilizzata per contrastare il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

Abstract: The objective of this study was to assess the antimicrobial activity of conventional antibiotics, organic acids and nature identical compounds against five field strains of *Streptococcus suis*, and then to examine whether the combination of these substances could support the action of not effective antibiotics against one of the most common serotypes worldwide. A minimal inhibitory concentration (MIC) test was first performed using the microdilution method following the CLSI guidelines. Tetracycline, neomycin, tylosin, and tiamulin showed variable sensitivity patterns and the higher MIC values. Among the tested organic acids and nature identical compounds, citric acid, dodecanoic acid, and thymol had the most marked inhibitory effect. Therefore, these compounds were combined in order to create a prototype, used to increase the efficacy of the abovementioned antibiotics. The combination was tested against strain 703 (serotype 2) and supported the action of the four conventional antibiotics, inhibiting bacterial growth between 74 and 92% overall. The mixture of citric acid, dodecanoic acid, and thymol can thus be used to counteract the antibiotic resistance issue.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis è un batterio Gram positivo anaerobio facoltativo che rappresenta una minaccia nell'ambito della suinicoltura ed un emergente agente zoonotico. Il target del

patogeno sono suinetti post-svezzamento, nei quali si manifesta clinicamente con gravi sintomi sistemici. Sebbene la principale via di trasmissione sia tramite aerosol e contatto nasale con successiva colonizzazione sistemica, recentemente è stato ipotizzato un modello di interazione ospite-patogeno attraverso il tratto gastrointestinale (Ferrando and Schultsz, 2016).

A livello globale sono riconosciuti 35 sierotipi e più di 600 tipi di sequenza: per questo motivo, la complessità e la variabilità genetica di *Streptococcus suis* rappresentano il problema principale nella realizzazione di un vaccino funzionale nei confronti di diversi ceppi batterici (Goyette-Desjardins et al., 2014) it is a zoonotic agent causing severe infections to people in close contact with infected pigs or pork-derived products. Although considered sporadic in the past, human *S. suis* infections have been reported during the last 45 years, with two large outbreaks recorded in China. In fact, the number of reported human cases has significantly increased in recent years. In this review, we present the worldwide distribution of serotypes and sequence types (STs). Ne consegue che la terapia antibiotica sia il principale metodo di trattamento degli animali, sebbene numerose resistenze siano state registrate in tutto il mondo (Hadjirin et al., 2021). Per supportarne un utilizzo giudizioso, l'Istituto degli standard clinici e di laboratorio (CLSI) ha definito per il suino le condizioni sperimentali ed i breakpoint clinici di sei antibiotici, quali ampicillina, ceftiofur, entrofloxacin, florfenicolo, penicillina G e tetraciclina (CLSI, 2020). Di fondamentale importanza è quindi cercare di ricorrere ad alternative agli antibiotici, come per esempio acidi organici e composti naturali identici, già ampiamente utilizzati come additivi per mangimi grazie alle loro molteplici proprietà.

Lo scopo dello studio è stato di valutare l'attività antimicrobica di antibiotici convenzionali e sostanze alternative agli antibiotici (acidi organici e composti naturali identici) contro cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* e, in secondo luogo, verificare se la combinazione di queste categorie di sostanze potesse supportare l'azione di antibiotici convenzionali non efficaci.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e condizioni di crescita

Cinque ceppi di campo sono stati acquistati dalla Biobanca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Durante gli esperimenti i ceppi, codificati con i codici 259 (sierotipo 1), 260 (sierotipo 1/2), 701 (sierotipo 3), 702 (sierotipo 12) e 703 (sierotipo 2), sono stati coltivati in brodo Mueller Hinton addizionato di calcio e magnesio (CAMHB) e 5% sangue lisato di cavallo (LHB).

Composti testati

Gli stock degli antibiotici testati (ampicillina, penicillina G, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicolo, tetraciclina, doxiciclina, neomicina, tilosina, tiamulina ed amoxicillina) e di acido citrico, acido sorbico, acido benzoico e acido esanoico sono stati preparati in CAMHB. Gli stock di acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo sono stati preparati in etanolo 70% v/v. Tutti gli stock sono stati portati a pH 6.5 e filtrati con filtri 0.2 µm.

Primo esperimento – MIC test composti singoli

Gli antibiotici sono stati testati nei range indicati in Tabella 1. Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico ed acido esanoico sono stati testati in diluizioni scalari da 100 a 1.56 mM, mentre acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo da 7.5 a 0.12 mM.

Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di antibiotici, acidi organici e composti naturali identici è stato determinato con test di microdiluzione in CAMHB + LHB pH 6.5, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione in presenza di ogni ceppo di *S. suis* (inoculo corrispondente allo Standard McFarland 0.5). Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire un'assorbanza nulla dopo 24 ore di incubazione.

Secondo esperimento – combinazioni antibiotici + prototipo

In base ai risultati preliminari, sono stati individuati i composti bioattivi con maggiore attività inibitoria: acido citrico, timolo e acido dodecanoico sono stati utilizzati per preparare un prototipo proprietario di Vetagro SpA. Questo prototipo è stato quindi testato in combinazione ad antibiotici per cui sono state riscontrate maggiori resistenze o elevati valori MIC, ossia tetraciclina, neomicina, tilosina e tiamulina. In particolare, questo secondo esperimento è stato eseguito sul ceppo 703, poiché il sierotipo 2 è uno dei più studiati e diffusi a livello globale (Guo et al., 2021) serotype 2 is most frequently associated with infections in pigs and humans. To better understand the virulence characterization of *S. suis* serotype 2 (SS2). Con il medesimo metodo sopracitato è stata verificata la variazione di percentuale di crescita batterica in presenza delle combinazioni rispetto alle sostanze singole.

Analisi statistica

I dati del secondo esperimento (combinazioni antibiotico + prototipo) sono stati analizzati con one-way ANOVA seguita dal test Tukey e le differenze sono state considerate significative a $p \leq 0.05$.

RISULTATI

MIC test – composti singoli

La distribuzione dei valori MIC degli antibiotici è riportata nella Tabella 1. Secondo i criteri del CLSI, i cinque ceppi di *S. suis* sono risultati sensibili ad ampicillina, penicillina G, ceftiofur e florfenicolo. Tre ceppi sono stati categorizzati come intermedi rispetto alla enrofloxacin ed i due restanti ceppi come sensibili. Infine, quattro resistenze sono state registrate nei confronti della tetraciclina, alla quale il ceppo 703 è risultato intermedio.

Per quanto riguarda gli antibiotici per cui non sono definiti criteri interpretativi standardizzati, la più bassa concentrazione testata (0.5 µg/mL) è stata individuata come MIC di tutti i ceppi nei confronti di amoxicillina e di quattro ceppi nei confronti di doxiciclina. Valori MIC ≥ 16 µg/mL sono stati registrati per la neomicina e per il ceppo 701 nei confronti di tilosina e doxiciclina. I valori MIC di tilosina e tiamulina dei restanti ceppi batterici sono risultati compresi tra 1-4 µg/mL.

	AMP	PEN	CEF	ENR	FLO	TET	DOX	NEO	TYL	TIA	AMX
Range (µg/mL)	0.25-32	0.12-16	0.5-64	0.25-32	0.5-64	0.25-32	0.5-64	0.5-64	0.5-64	0.5-64	0.5-64
259	0.25	0.12	0.5	1	2	2	0.5	16	2	4	0.5
260	0.25	0.12	0.5	1	2	2	0.5	16	2	4	0.5
701	0.25	0.12	0.5	0.5	2	> 64	16	16	2	4	0.5
702	0.25	0.12	0.5	0.5	2	4	0.5	32	> 64	1	0.5
703	0.25	0.12	0.5	1	2	1	0.5	16	1	4	0.5

Tabella 1 – Valori MIC in µg/mL dei ceppi di *S. suis* dopo 24 ore in presenza di antibiotici. Secondo i criteri del CLSI i valori in verde, arancione o rosso indicano che il ceppo ricade rispettivamente nelle categorie sensibile, intermedio o resistente. AMP: ampicillina, PEN: penicillina G, CEF: ceftiofur, ENR: enrofloxacin; FLO: florfenicolo; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina; NEO: neomicina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; AMX: amoxicillina.

Table 1 – MIC values in µg/mL of *S. suis* strains after 24 hours in the presence of antibiotics. According to the CLSI criteria, the values in green, orange, and red indicate that the strain falls into the sensitive, intermediate or resistant category, respectively. AMP: ampicillin, PEN: penicillin G, CEF: ceftiofur, ENR: enrofloxacin; FLO: florfenicol; TET: tetracycline; DOX: doxycycline; NEO: neomycin; TYL: tylosin; TIA: tiamulin; AMX: amoxicillin.

La media di crescita batterica ed i valori MIC di acidi organici e composti naturali identici sono mostrati nella Figura 1. I valori MIC si sono rivelati univoci per i cinque ceppi in esame. La vanillina non ha avuto effetto inibitorio completo sui ceppi batterici alle dosi testate. Al contrario, acido sorbico, benzoico ed esanoico hanno presentato una MIC corrispondente a 100 mM. L'acido citrico e l'acido ottanoico hanno inibito la crescita dei ceppi rispettivamente alle dosi di 50 mM e 7.5 mM. Infine, la MIC di acido decanoico, acido dodecanoico, timolo e carvacrolo è stata registrata a 1.87 mM, mentre quella dell'eugenolo a 3.75 mM.

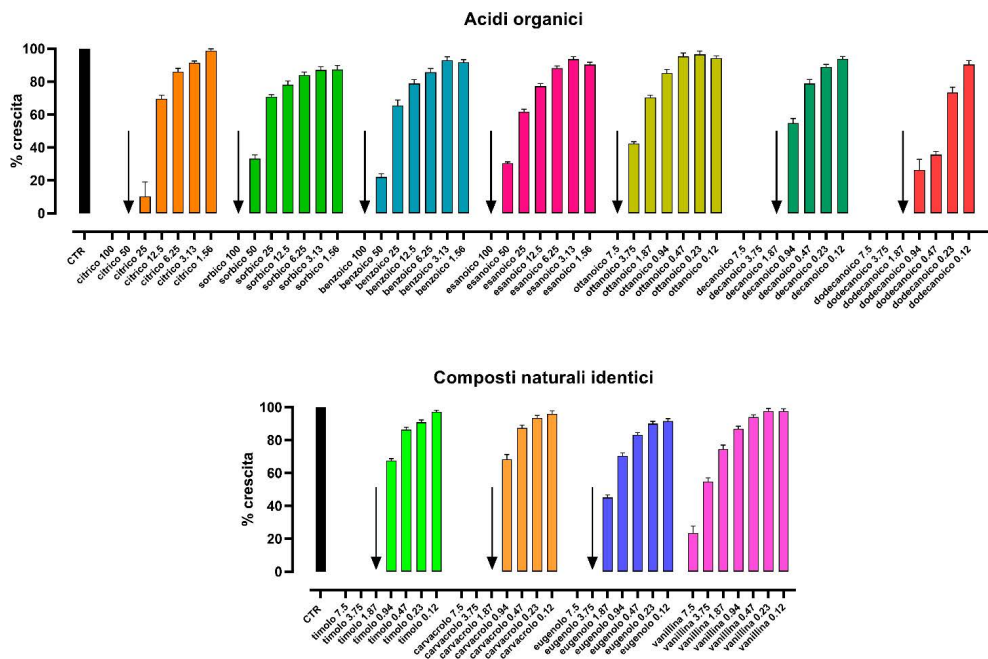


Figura 1 – Crescita dei cinque ceppi di *S. suis* (media dei tre replicati tecnici dei cinque ceppi \pm SEM) dopo 24 ore in presenza di acidi organici e composti naturali identici. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (media ceppi senza trattamenti). Le concentrazioni di acidi organici e composti naturali identici sono espresse in mM e le frecce indicano le MIC.

Figure 1 – Growth of the five *S. suis* strains (mean of the three technical replicates of the five strains \pm SEM) after 24 hours in the presence of organic acids and nature identical compounds. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strains without treatments only). Concentrations of organic acids and nature identical compounds are expressed in mM and arrows indicate MIC.

MIC test – combinazioni

L'utilizzo del prototipo costituito da acido citrico, timolo ed acido dodecanoico ha permesso di aumentare l'efficacia degli antibiotici selezionati nei confronti del ceppo 703. La Figura 2 riporta le percentuali di crescita di *S. suis* 703 in presenza delle sostanze singole utilizzate a concentrazioni inferiori alla MIC ed in presenza della combinazione delle stesse concentrazioni. Le sostanze singole si sono confermate non efficaci, mentre le combinazioni hanno permesso complessivamente un'inibizione batterica compresa tra il 74 ed il 92%.

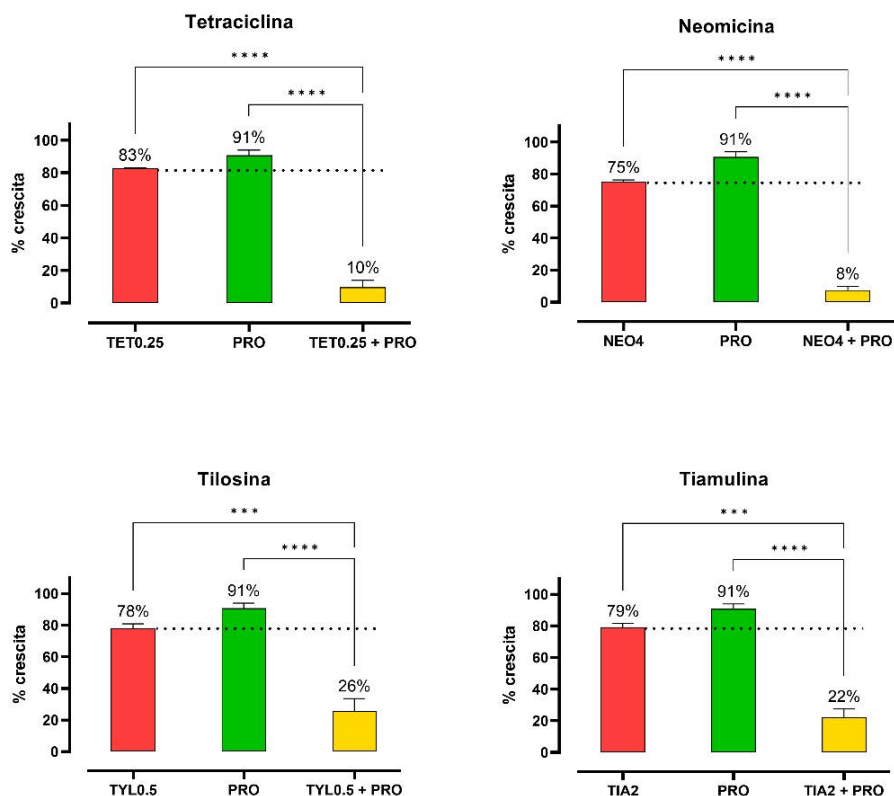


Figura 2 – Crescita di *S. suis* 703 (media dei tre replicati tecnici \pm SEM) dopo 24 ore in presenza di sostanze singole (tetraciclina, neomicina, tilosina, tiamulina e prototipo) e loro combinazioni (antibiotico + prototipo). Le concentrazioni degli antibiotici sono espresse in $\mu\text{g}/\text{mL}$. I dati sono stati analizzati tramite one-way ANOVA e gli asterischi indicano valori statisticamente significativi (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). TET: tetraciclina; NEO: neomicina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; PRO: prototipo.

Figure 2 – Growth of *S. suis* 703 (mean of the three technical replicates \pm SEM) after 24 hours in the presence of single substances (tetracycline, neomycin, tylosin, tiamulin, and prototype) and their combinations (antibiotic + prototype). Concentrations of antibiotics are expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data were analyzed with one-way ANOVA and asterisks indicate statistically significant values (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). TET: tetracycline; NEO: neomycin; TYL: tylosin; TIA: tiamulin; PRO: prototype.

DISCUSSIONE

In questo studio l'attività antimicrobica di antibiotici, acidi organici e composti naturali identici è stata valutata nei confronti di cinque ceppi di campo di *Streptococcus suis* utilizzando la metodologia standardizzata consigliata dal CLSI (CLSI, 2020). Gli antibiotici testati includevano il panel indicato dal CLSI ed altri comunemente utilizzati in suinicoltura. La risposta agli antibiotici è stata variabile a seconda delle diverse classi e, talvolta, anche tra i diversi ceppi. Tutti i ceppi sono risultati sensibili agli antibiotici inibitori della sintesi della parete cellulare, ossia il gruppo delle penicilline (ampicillina, penicillina G, amoxicillina) ed il ceftiofur. Un pattern di sensibilità analogo ed omogeneo è stato registrato nei confronti

del florfenicolo, unico inibitore della sintesi proteica efficace. La risposta dei ceppi nei confronti dei restanti antibiotici è stata invece variabile. L'enrofloxacin, un fluorochinolone che inibisce la sintesi del DNA, è risultata efficace su due ceppi, mentre i restanti sono stati classificati come intermedi. Infine, i quattro inibitori della sintesi proteica sono stati i meno efficaci: quattro ceppi sono risultati resistenti alla tetraciclina e, sebbene nessun intervallo di sensibilità sia ufficialmente definito, i valori MIC di neomicina, tilosina e tiamulina sono risultati essere elevati. A differenza degli antibiotici, acidi organici e composti naturali identici hanno evidenziato un'attività antimicrobica più costante: acido citrico, acido dodecanoico e timolo sono stati combinati in un prototipo testato insieme ad antibiotici non efficaci (tetraciclina, neomicina, tilosina, tiamulina) al fine di valutare il possibile aumento di attività antimicrobica di questi ultimi. Per questo secondo esperimento, il ceppo 703 è stato selezionato tra i cinque ceppi testati in quanto il sierotipo 2 è uno tra i più diffusi ed è il sierotipo di riferimento in numerosi studi bibliografici.

La aggiunta del prototipo agli antibiotici ha permesso di supportarne l'azione antimicrobica in maniera statisticamente significativa. L'acido dodecanoico ed il timolo hanno un meccanismo di azione simile. L'acido dodecanoico è un acido grasso a media catena con forte azione antimicrobica data dalla permeabilizzazione della membrana batterica e principalmente diretta verso batteri Gram positivi (Casillas-Vargas et al., 2021). Il timolo a differenza dell'acido dodecanoico ha effetto sia su Gram positivi che negativi, distruggendo la membrana batterica tramite la formazione di pori ed inibendo le pompe di efflusso batteriche (Kachur and Suntres, 2020)2020. Infine l'acido citrico, una volta entrato indissociato nel batterio, si dissocia diminuendo il pH intracellulare e causando danni strutturali e funzionali (Burel et al., 2021). Queste tre sostanze potrebbero agire sinergicamente per supportare l'attività antimicrobica dei quattro antibiotici inibitori della sintesi proteica. Il timolo e l'acido dodecanoico potrebbero facilitare l'entrata dei farmaci nella cellula, dopodiché il composto naturale identico potrebbe inibire l'estruzione dei farmaci dalla cellula batterica, andando ad inibire le pompe di membrana. Una volta all'interno del batterio, l'azione degli antibiotici e dell'acido citrico potrebbe ulteriormente agire sinergicamente nell'inibizione della crescita batterica.

CONCLUSIONI

In questo studio la combinazione di un prototipo composto da acido citrico, acido dodecanoico e timolo ha permesso il miglioramento dell'azione di diversi antibiotici rispetto ad un ceppo di campo di *S.suis* sierotipo 2. Ne consegue che questa miscela di acidi organici e timolo possa essere utilizzata per contrastare resistenze ad antibiotici determinate in campo, al fine di combattere il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Burel C, Kala A, Purevdorj-Gage L (2021) Impact of pH on citric acid antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 72(3): 332–340.
2. Casillas-Vargas G, Ocasio-Malavé C, Medina S, Morales-Guzmán C, Del Valle RG, Carballeira NM, Sanabria-Ríos DJ (2021) Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research* 82: 101093.
3. CLSI (2020) VET01S: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animal 5th Edition.
4. Ferrando ML, Schultsz C (2016) A hypothetical model of host-pathogen interaction of *Streptococcus suis* in the gastro-intestinal tract. *Gut Microbes* 7(2): 154–162.
5. Goyette-Desjardins G, Auger J-P, Xu J, Segura M, Gottschalk M (2014) *Streptococcus*

- suis, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* 3(6): e45.
6. Guo G, Du D, Yu Y, Zhang Y, Qian Y, Zhang W (2021) Pan-genome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2 revealed genomic diversity among strains of different virulence. *Transbound Emerg Dis* 68(2): 637–647.
 7. Hadjirin NF, Miller EL, Murray GGR, Yen PLK, Phuc HD, Wileman TM, Hernandez-Garcia J, Williamson SM, Parkhill J, Maskell DJ, Zhou R, Fittipaldi N, et al. (2021) Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biology* 19(1): 191.
 8. Kachur K, Suntres Z (2020) The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(18): 3042–3053.