

**VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' AD ANTIMICROBICI DI *B. hyodysenteriae*: CONFRONTO TRA DUE METODI**

***EVALUATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF B. hyodysenteriae: COMPARISON BETWEEN TWO METHODS***

MAGISTRALI, C.F.<sup>1</sup>, CUCCO, L.<sup>1</sup>, D'AVINO, N.<sup>1</sup>, D'ANGELO, G.<sup>1</sup>, GHERPELLI, Y.<sup>2</sup>, BONILLAURI, P.<sup>2</sup>, MERIALDI, G.<sup>3</sup>

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy; 2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Reggio Emilia; 3 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Bologna.*

**PAROLE CHIAVE:** MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, metodo, breakpoint

**KEY WORDS:** MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, method, breakpoint

**RIASSUNTO**

Scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto due diversi metodi disponibili per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici di *Brachyspira hyodysenteriae*. Sono stati esaminati due differenti test per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC): il test di diluizione in agar (Quick-MIC) e il test di diluizione in brodo. 20 stipiti di *B. hyodysenteriae*, isolati da suini affetti da dissenteria suina in allevamenti italiani sono stati esaminati indipendentemente ed in cieco da due diversi laboratori diagnostici. I risultati hanno confermato quanto già descritto in letteratura: il metodo di diluizione in brodo tende a fornire MIC più basse in media rispetto al metodo di diluizione in agar. Utilizzando i breakpoint indicati da Ronne e Szancer (1990) alcuni ceppi classificati come intermedi con il metodo di diluizione in agar (Quick-MIC) sono risultati sensibili con il metodo di diluizione in brodo. Tuttavia, nessun isolato classificato come resistente in diluizione in agar è risultato sensibile in diluizione in brodo o viceversa. Concludendo, la classificazione di un isolato di *B. hyodysenteriae* può variare a seconda del metodo impiegato per la determinazione della MIC, in particolare per i ceppi che presentano un valore intermedio.

**ABSTRACT**

The aim of this study was to compare two different methods available for the evaluation of antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae*. Two different tests used for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) were compared: the Quick-MIC agar dilution method and the Broth dilution method. 20 *B. hyodysenteriae* strains, isolated from pigs affected by Swine Dysentery of Italian swine herds were tested blindly and independently by two different diagnostic laboratories. Results confirmed what already described in literature: the Broth dilution method give lower MICs compared to the agar dilution method (Quick MIC). According to the MIC breakpoints thresholds (Ronne & Szancer, 1990), some strains classified as intermediate by the agar dilution method (Quick MIC), resulted sensitive by the Broth Dilution method. Nevertheless, no isolate was classified resistant by agar dilution method (Quick MIC) resulted sensitive by the Broth Dilution Method or vice versa. In conclusion, classification of *B. hyodysenteriae* isolates in different susceptibility groups using the two tests can occur, in particular for those showing intermediate values.

## INTRODUZIONE

*Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente della dissenteria suina (SD), una patologia ben conosciuta, che tuttavia causa ancora notevoli danni economici negli allevamenti suini italiani. Il controllo della SD in allevamento è tradizionalmente legato all'impiego di antimicrobici, che sono utilizzati con successo anche in corso di programmi di eradicazione. Nel corso degli anni, sono stati consigliati diversi farmaci, tra i quali carbadox, dimetridazolo, tilosina, pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e lincomicina (Harris, 1999). Alcuni di questi antimicrobici sono stati però recentemente esclusi dall'impiego in zootecnia, a causa di potenziale effetto negativo per la salute umana, mentre altri sono stati progressivamente abbandonati per l'insorgenza di resistenze. Le pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e la lincomicina sono quindi i più importanti composti per il trattamento delle infezioni da *B. hyodysenteriae*. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, sono state segnalate resistenze anche nei confronti di questi antibiotici, resistenze che hanno destato notevole preoccupazione tra gli operatori del settore (Grasham, 1998; Karlsson, 2002; Karlsson, 2004;). In questo contesto, la disponibilità di un test per la valutazione in vitro della sensibilità di *B. hyodysenteriae* agli antimicrobici appare rivestire un ruolo chiave.

Nonostante questo, non esistono metodi standardizzati per la valutazione dell'antibiotico-sensibilità del genere *Brachyspira*, poiché la normativa internazionale non raccomanda l'utilizzo del tradizionale antibiogramma, o Kirby-Bauer, per i batteri anaerobi (CLSI, ex NCCLS M11-A6,1 2004).

Il test maggiormente impiegato fino al 2002 si basava quindi su una valutazione della minima concentrazione inibente in diluizione in gel d'agar; a questo si è recentemente affiancato un metodo in brodo (Karlsson, 2002).

Scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto le due metodiche, utilizzandole su di un pannello di 20 ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da suini affetti da SD in allevamenti italiani. I test sono stati effettuati in cieco da due diversi laboratori diagnostici.

## MATERIALI E METODI

Isolati: venti ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da casi di dissenteria suina in allevamenti italiani sono stati utilizzati per lo studio. Gli isolati sono stati mantenuti in Microbank (Prolab Diagnostic, Richmond hill, Canada) a -80°C fino al momento dell'analisi. In seguito, i ceppi sono stati seminati in Agar sangue al 5% sangue di montone, e incubati in anaerobiosi a 42°C per 3-5 giorni. Dopo l'incubazione, la purezza del ceppo è stata verificata mediante microscopia ottica.

Metodo di diluizione in brodo: il metodo è stato effettuato sulla base di quanto già descritto da Rohde (2004). In breve, ciascun isolato è stato seminato su Anaerobe Fastidious Agar (LAB-M Ltd, UK) in anaerobiosi a 42°C per 72 ore. Dopo un controllo di purezza in microscopia, il ceppo è stato sospeso in BHI, ad una concentrazione di 10<sup>8</sup> ufc/ml circa. 300 µl della sospensione sono stati quindi aggiunti a 30 mL di BHI+ calf fetal serum (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), fino ad ottenere una concentrazione di 10<sup>6</sup> ufc/ml circa. 0,5 ml di questa sospensione sono stati seminati in ciascun pozzetto di piastra VetMIC Brachy (SVA, Uppsala, Sweden) e incubati in anaerobiosi a 37°C per 4 giorni con agitazione continua. Un ceppo di *Brachyspira hyodysenteriae* (ATCC 27164, B78) è stato impiegato come controllo. Le concentrazioni testate sono state le seguenti: tiamulina: 0.063 µg/ml; 0,125 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml, 1 µg/ml; 2 µg/ml; 4 µg/ml; 8 µg/ml. Valnemulina: 0.031 µg/ml; 0.063 µg/ml; 0,125 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml, 1 µg/ml; 2 µg/ml; 4 µg/ml; Lincomicina: 0,5 µg/ml, 1 µg/ml; 2 µg/ml; 4 µg/ml; 8 µg/ml; 16 µg/ml; 32 µg/ml; 64 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.

Metodo di diluizione in agar (Quick MIC): è stato effettuato un metodo di diluizione in agar semplificato, utilizzando solo i valori di breakpoint per ciascun antibiotico, sulla base di quanto descritto da Ronne e Szancer (1990).

Le interpretazioni dei valori di MIC per entrambi i test sono state effettuate sulla base dei valori di Breakpoint riportati da Ronne e Szancer (1990) : Tiamulina:  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ : sensibile;  $>1- \leq 4 \mu\text{g/ml}$ : intermedio;  $>4 \mu\text{g/ml}$ : resistente. Valnemulina:  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ : sensibile;  $>1- \leq 4 \mu\text{g/ml}$ : intermedio;  $>4 \mu\text{g/ml}$ : resistente. Lincomicina:  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ : sensibile;  $>4- \leq 36 \mu\text{g/ml}$ : intermedio;  $>36 \mu\text{g/ml}$ : resistente.

## RISULTATI

I risultati ottenuti sono indicati in tabella 1 e 2; per tiamulina 8 ceppi sono stati classificati come intermedi in diluizione in gel d'agar, e sensibili in metodo di diluizione in brodo: tutti questi ceppi mostravano valori di MIC superiori a 0,125 mcg/ml nel test di diluizione in brodo. Lo stesso risultato, vale a dire stipiti risultati come intermedi in diluizione in agar e sensibili in diluizione in brodo, si è verificata per 5 ceppi per valnemulina e 7 per lincomicina. Nessun ceppo classificato come sensibile da uno dei due metodi è stato giudicato come resistente dall'altro.

**Tabella 1:** Valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* valutati mediante test di diffusione in agar (n=20)

**Table 1:** MIC values of *B. hyodysenteriae* isolates by Agar Diffusion technique (n=20)

Antibiotico	Valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) e interpretazione (S,I,R)				
	<1 (S)	1-4 (I)	>4 (R)	4-36 (I)	>36 (R)
<b>Tiamulina</b>	5	10	5		
<b>Valnemulina</b>	7	6	7		
<b>Lincomicina</b>				12	8

**Tabella 2:** valori di MIC degli isolate di *B. hyodysenteriae* valutati mediante test di diluizione in brodo (n=20). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. I ceppi resistenti sono indicati in grassetto.

**Table 2:** MIC values of *B. hyodysenteriae* isolates by Broth Dilution Method (n=20). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.

Antibiotico	Valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )											
	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<b>Tiamulina</b>		1	2	5	2	3	1	1	<b>4</b>			
<b>Valnemulina</b>	2	1	2	1	4	1	3	<b>6</b>				
<b>Lincomicina</b>							1	6	2	3	1	<b>7</b>

## DISCUSSIONE

La necessità di standardizzare i test per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici di *B. hyodysenteriae* è stata da più parte evocata, in particolare da quando il test di diluizione in brodo è stato descritto da Karlsson e collaboratori a partire dal 2001 (Karlsson, 2002). Non sono, infatti, disponibili circuiti interlaboratorio per questo genere batterico, e un ring test internazionale,

organizzato nel periodo 2002-2004, ha rilevato una forte variabilità inter-laboratorio, sia nelle metodiche per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici, che negli esiti forniti (Rasback, 2005). Il confronto tra i due test più importanti, quello di diffusione in agar e quello in brodo, è stato effettuato da alcuni autori: in generale, i lavori disponibili in letteratura concordano nel rilevare come le MIC fornite dal test in brodo si collocano su valori di 1-2 diluizioni più basse rispetto a quelle ottenute con il test in agar (Rasback, 2004; Rohde, 2004), come peraltro già indicato nella normativa di riferimento (NCCLS M11-A4). Queste differenze sono normalmente contenute a 1-2 fattori di diluizione, ma possono influenzare l'attribuzione di un ceppo alle diverse classi di sensibilità (Karlsson, 2002), per le quali si utilizzano i criteri d'interpretazione proposti da Ronne e Szancer nel 1990 (Ronne & Szancer, 1990).

Anche nel corso di questo lavoro, si è confermata la tendenza del test in brodo a fornire valori MIC mediamente più bassi rispetto al metodo in agar.

Nel nostro caso, nessun ceppo risultato sensibile con una metodica ha dato esito resistente con l'altra o viceversa, dimostrando una buona concordanza dei due test per ceppi chiaramente sensibili o resistenti; tuttavia, alcuni stipti categorizzati come sensibili in diluizione in brodo sono stati valutati intermedi applicando il test in agar.

## CONCLUSIONI

La buona concordanza dei due metodi per i ceppi chiaramente resistenti garantisce il rilievo di questi all'interno degli allevamenti esaminati. E' tuttavia importante, a nostro parere, nell'interpretazione del dato analitico, fare riferimento alla metodica impiegata contestualmente all'esito. Inoltre, congiuntamente alla categorizzazione del ceppo in sensibile, intermedio o resistente, è opportuno rilevare il valore quantitativo della MIC, poiché, nel caso della tiamulina, l'insorgenza di un'eventuale resistenza avviene in modo graduale (Karlsson, 2004).

## BIBLIOGRAFIA

- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 2004. "Method for Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria" sisith ed. Approved standards M11-A6. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Gresham A.C., Hunt B.W., Dalziel R.W. (1998) "Treatment of swine dysentery – problems of antibiotic resistance and concurrent salmonellosis ". Vet Rec 143, 619.
- Harris D.L., Hampson D.J., Glock R.D. (1999) "Swine Dysentery". In: Straw B.E., D'Allaire A., Mengeling W.L., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 8<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press. Ames, Iowa U.S.A., 579-600.
- Karlsson M., Oxberry S.L., Hampson D.J. (2002) "Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method". Vet. Microbiol. 84, 123-133.
- Karlsson M., Aspan A., Landen A., Franklin A. (2004) "Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin" Journal of Medical Microbiology. 53, 281-285.
- Rasback T., Fellstrom C., Bergsjö B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S.M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M. (2005). "Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test". Vet. Microbiol. 109, 229-243.
- Rohde J., Kessler M., Baums C.G., Amtsberg G. (2004) "Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany". Vet. Microbiol. 102, 25-32.
- Ronne H., Szancer J. (1990) "In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemiotherapeutics". In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland, 126.