

ANALISI DELLA SENSIBILITA' DI CEPPI DI *Pasteurella multocida* E DI *Actinobacillus pleuropneumoniae* A TILMICOSINA: CONFRONTO TRA KIRBY-BAUER, MIC ED EFFICACIA IN CAMPO

SENSIBILITY ANALYSIS OF *Pasteurella multocida* E DI *Actinobacillus pleuropneumoniae* STRAINS TO TILMICOSIN: COMPARISON BETWEEN KIRBY-BAUER, MIC METHODS AND FIELD EFFICACY

GUADAGNINI G.¹, FERRO P.², SALVINI F.¹, ZANONI MG³., ALBORALI G.L.³

¹libero professionista PIGVET, Brescia;

²Elanco Animal Health, Sesto Forentino (FI);

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Parole chiave: MIC, Kirby-Bauer, tilmicosina

Keywords: MIC, Kirby-Bauer, tilmicosina

Riassunto. *P.multocida* e *A.pleuropneumoniae* sono due patogeni rilevanti nel complesso della malattia respiratoria (PRDC). La sensibilità agli antibiotici viene normalmente valutata in vitro mediante la metodica Kirby-Bauer. L'isolamento di ceppi, soprattutto di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, risultati in vitro resistenti nei confronti di tilmicosina con discordanti effetti in campo ha indotto ad approfondire le indagini di laboratorio. A tal proposito sono stati selezionati 30 ceppi di *P.multocida* e 19 ceppi di *A.pleuropneumoniae* isolati in episodi di malattia respiratoria e testati per la valutazione della sensibilità in vitro verso tilmicosina utilizzando il test Kirby-Bauer e Minima Concentrazione Inibente. Tra questi ceppi sono stati inclusi ceppi isolati da focolai di malattia respiratoria che hanno mostrato resistenza in vitro con test Kirby-Bauer mentre l'utilizzo in campo è risultato efficace. Dal confronto dei risultati di laboratorio è emerso che la sensibilità evidenziata con il test kb è minore rispetto a quella osservata con MIC. Il 65,2 % dei ceppi di *P.multocida* sono risultati sensibili al primo test e il 96,6% alla MIC mentre per *A.pleuropneumoniae* è stata dimostrata una sensibilità del 10,5 % rispetto al 90 % evidenziata mediante MIC.

Abstract. *P.multocida* and *A.pleuropneumoniae* are relevant pathogens of porcine respiratory complex disease. The antibiotic susceptibility is tested using Kirby-Bauer method. The resistance to tilmicosin of some strains, specially for *A. pleuropneumoniae*, and the contemporary efficient treatment with tilmicosin in field showed the necessity to understand more about the laboratory research. 30 strains of *P.multocida* and 19 strains of *A.pleuropneumoniae* are tested for susceptibility to tilmicosin using Kirby-Bauer method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) method to compare results. In these strains we analyse some strains that shows resistance to antimicrobial susceptibility test using Kirby-Bauer method but collected from farms with respiratory disease where tilmicosin showed field efficacy when used in therapy. Susceptibility observed using Kirby Bauer test is lower than MIC. 65,2 % of *P.multocida* strains were susceptibilty using Kirby Bauer test and il 96,6% with MIC while about *A.pleuropneumoniae* 10,5 % were became 90 % with MIC.

INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria suina è una sindrome multifattoriale sostenuta dall'azione contemporanea e sinergica di agenti infettivi che si esprime attraverso quadri clinici ed anatomo-patologici complessi, di difficile diagnosi e risoluzione.

P.multocida e *A.pleuropneumoniae* sono due dei principali agenti batterici in grado di causare polmonite nel suino.

P.multocida è un coccobacillo gram negativo, è anaerobio facoltativo ed in vitro cresce nella maggior parte dei terreni di arricchimento. Si conoscono 5 sierotipi capsulari, ma solamente tre sono di interesse suino. Le lesioni da *P.multocida* sono tipicamente polmonari: si rilevano aree di epatizzazione rossa che non si possono considerare patognomiche, poiché spesso agisce in sinergia con altri patogeni del complesso respiratorio suino (Pijoan, 2006)

A.pleuropneumoniae è l'agente della pleuropolmonite suina, è un gram negativo di piccole dimensioni, con forma bacillare o coccobacillare incapsulata. Generalmente la crescita in vitro necessita di sangue con aggiunta di NAD. Si conoscono 2 biotipi e in 15 sierotipi. Caratteristica del biotipo 1 è la crescita in vitro in forma satellitare a colonie di *Staphilococcus aureus* di cui aumenta la caratteristica parziale emolisi. Il biotipo 2 non necessita della presenza di NAD e di conseguenza si sviluppa indipendentemente dal zona satellite alle colonie di *Staphilococcus aureus*. *A.pleuropneumoniae* è produttore di citolisine APX I, APX II, APX III, APX IV essenziali per l'azione patogena e istolesiva. Per quanto riguarda le lesioni anatomiche patologiche, si rilevano aree di polmonite localizzata a livello dei lobi apicali e del lobo cardiaco, mentre nei lobi diaframmatici, la lesione è spesso focale e ben demarcata. Le aree di polmonite appaiono scure e solide, mentre la pleurite fibrinosa, molto evidente in animali in fase acuta, tende a ricoprire tutto il polmone e ad aderire completamente alla pleura parietale. (Gottschalk & Taylor, 2006)

In episodi di malattia respiratoria in presenza di *P.multocida* e *A.pleuropneumoniae* tilmicosina può essere considerata uno degli antimicrobici da utilizzare per la terapia orale. La sua efficacia è dimostrata in vitro (Paradis MA et al 2002) ed in vivo (Mortimer et al 2002).

Negli ultimi anni sono stati segnalati ripetutamente episodi di malattia respiratoria che hanno coinvolto questi due patogeni in cui tilmicosina a fronte di una resistenza osservata in laboratorio al test Kirby Bauer si è dimostrata efficace in campo. I ceppi isolati in focolai di malattia respiratoria con questa caratteristica sono stati conservati per approfondimenti in merito alla loro particolare sensibilità in vitro.

Questa situazione ripetuta nel tempo ha suggerito di analizzare contemporaneamente i ceppi di *P.multocida* e di *A.pleuropneumoniae* isolati in questi episodi sia mediante la tecnica Kirby-Bauer, sia stabilendo la Minima Concentrazione Inibente (MIC) mediante diluizioni scalari in terreno liquido.

MATERIALI E METODI

P.multocida è stata isolata su terreno agar sangue semplice mentre l'*A.pleuropneumoniae* in terreno agar sangue addizionato con NAD.

La sensibilità alla tilmicosina è stata valutata mediante la tecnica Kirby Bauer e MIC allestendo contemporaneamente le indagini di laboratorio per tutti i ceppi dei due patogeni conservati.

L'apposizione di un dischetto imbibito di antibiotico su una piastra inoculata con coltura batterica pura.

Per l'esecuzione dell'antibiogramma con metodica Kirby Bauer sono stati utilizzati terreni Mueller- Hinton agarizzati per la *P.multocida* mentre per l'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. È risultato necessario l'utilizzo di terreno arricchito denominato "Chocolate Mueller-Hinton agar".

Per eseguire il test di suscettibilità è necessaria la preparazione dell'inoculo, ottenuto mediante una sospensione batterica in brodo. Sono state prelevate colonie da una piastra in coltura pura del ceppo batterico da testare, precedentemente incubata per 24 ore, in modo da ottenere una torbidità standard di 0,5 McFarland. Entro 15 minuti dalla preparazione dell'inoculo, questo

è stato distribuito sul terreno solido, dopo essere stato adeguatamente mescolato in modo da evitare che parte della sospensione batterica possa restare attaccata alle pareti della provetta. Il terreno solido è stato totalmente ricoperto dalla sospensione batterica mediante l'utilizzo di un tampone ripetendo l'operazione 2-3 volte e contemporaneamente ruotando la piastra di 60° al fine di garantire una totale copertura del terreno. La piastra contenente il terreno inoculato è stata quindi coperta e lasciata 3-5 minuti a riposo; ogni eccesso di inoculo è stato asciugato prima di essere riposto il dischetto contenente antibiotico. Successivamente è stato posto sul terreno inoculato il dischetto contenente tilmicosina, assicurandosi che appoggiasse con tutta la superficie sul terreno.

In seguito le piastre sono state incubate in apposito termostato: *P.multocida* è stata incubata in termostato in aerobiosi a 35° C per 24 ore, mentre l'*A.pleuropneumoniae* è stato incubato in termostato con il 6% di CO₂. Il giorno seguente sono stati misurati manualmente gli aloni di inibizione attribuendo il carattere di sensibile/intermedio/resistente al ceppo testato.

Per quanto riguarda la prova di sensibilità eseguita mediante microdiluizioni scalari in terreno liquido al fine di stabilire la concentrazione minima inibente è stata necessaria la preparazione della soluzione antibiotata e del terreno culturale.

La soluzione madre di antibiotico è stata preparata a partire da polvere di Tilmicosina con peso e standard di attività noti.

Per il calcolo del volume è necessario considerare la seguente formula:

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potenza (g/mg)}}{\text{Concentrazione(g/ml)}}$$

Il solvente utilizzato è stato il glicole, la quantità minima di solvente è stata introdotta per stabilizzare la polvere antibiotica e quindi in seguito è stato aggiunto per arrivare alla concentrazione desiderata.

La soluzione madre è stata preparata ad una concentrazione di 2560 µg/ml utilizzando una cappa filtrante in modo da non contaminare la soluzione che è stata stoccata in criotube ad una temperatura di -80°C.

Al momento dell'analisi la soluzione madre di antibiotico è stata diluita 1:10 utilizzando Mueller-Hinton broth, raggiungendo una concentrazione di 256 µg/ml. Il brodo utilizzato per la crescita della *P.multocida* è stato il Mueller-Hinton Broth, il quale viene preparato sfruttando Mueller-Hinton liofilizzato (21g/l) al quale viene aggiunta acqua distillata. Il ph era compreso tra 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente (25°C) e dopo la preparazione il brodo è stato autoclavato e fatto riposare una notte a 4°C. Su ogni campione di terreno è stato eseguito il controllo di sterilità.

Per quanto riguarda *A.pleuropneumoniae* è stato utilizzato il VFM, Veterinary Fastidious Medium, che utilizza come base il Mueller-Hinton Broth al quale sono stati addizionati alcuni componenti necessari per la crescita del batterio. E' stato utilizzato il supplemento C BD Diagnostic costituito da un concentrato di lieviti. Ottenuti il brodo di coltura che differisce in base al batterio da testare e la soluzione madre di antibiotico, è stato necessario preparare l'inoculo batterico per poter eseguire il test antibiotico mediante microdiluizioni. E' stato necessario selezionare da 3 a 5 colonie con medesima morfologia dalla coltura pura e trasferire la patina in una provetta contenente 5 ml di brodo (MHB), incubare pochi minuti al fine di ottenere una torbidità simile al 0,5 Mc Farland, La soluzione con tale torbidità' contiene circa 1 o 2 × 10⁸ cfu/ml . Inoltre è stato utilizzare uno spettrofotometro per controllare la densità dell'inoculo. La soluzione è stata diluita in modo da ottenere una concentrazione finale in piastra di 5 × 10⁵ cfu/ml. L'inoculo è stato periodicamente controllato per determinare le unità formanti colonia (cfu).

Le diluizioni di antibiotico da testare sono state ottenute secondo il log in base 2 utilizzano

delle piastre microtitre 96 pozzetti. Su ogni piastra sono stati testati 4 ceppi batterici della stessa specie nei confronti di un unico antibiotico in diluizioni scalari. Nella tabella 1 è riportato lo schema della piastra utilizzata e la disposizione delle diluizioni di antibiotico.

Tabella 1 *Diluizioni scalari di antibiotico schema piastra utilizzato per la lettura della mic*
Table 1 *Antibiotic gradual dilution in microtitre plate and scheme of the plate used for MIC analysis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
1	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
2	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
2	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
3	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
3	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
4	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
4	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C

La piastra inocolata è stata incubata per 24 ore alla temperatura di 37° C. Il giorno seguente, prima di procedere alla lettura, è stata valutata la crescita nel controllo della carica batterica inocolata e solo se conforme si è proceduto con la lettura della MIC.

La Minima Concentrazione Inibente è stata considerata la concentrazione minima dell'antibiotico in grado di inibire la crescita del ceppo batterico e corrisponde alla quantità di antibiotico contenuto nell'ultimo pozzetto dove non si osserva torbidità o precipitato batterico.

La torbidità o il precipitato batterico dovevano essere presenti nel pozzetto 11 che rappresenta il controllo della crescita batterica, mentre il pozzetto 12 doveva risultare limpido in quanto controllo del terreno di coltura. (Anonimous, 2002)

Per la lettura dell'antibiogramma eseguito mediante la metodica Kirby-Bauer, è stato considerato un diametro minimo dell'alone di inibizione di 11 mm per giudicare un ceppo sensibile alla Tilmicosina.

Per quanto riguarda la microdiluizione scalare al fine di determinare la MIC, un ceppo è stato considerato sensibile alla Tilmicosina con una MIC minore o uguale a 16, mentre una MIC di 32 è stata assegnata la resistenza al ceppo testato.

RISULTATI

Pasteurella multocida

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati del test Kirby Bauer e MIC eseguiti per i ceppi di *P.multocida* .

CEPPI	KIRBY-BAUER	MIC
1	S	4 g/ml
2	R	4 g/ml
3	S	0,5 g/ml
4	R	1 g/ml
5	S	4 g/ml
6	S	2 g/ml
7	S	4 g/ml
8	S	1 g/ml
9	S	0,5 g/ml
10	S	4 g/ml
11	R	8 g/ml
12	S	2 g/ml
13	S	64 g/ml
14	R	8 g/wml
15	R	4 g/ml
16	R	2 g/ml
17	R	4 g/ml
18	S	4 g/ml
19	S	1 g/ml
20	S	0,5 g/ml
21	R	1 g/ml
22	R	1 g/ml
23	S	1 g/ml
24	S	4 g/ml
25	R	2 g/ml
26	R	4 g/ml
27	R	4 g/ml
28	R	4 g/ml
29	S	1 g/ml
30	S	0,5 g/ml

Tabella 2 Risultati dei test di sensibilità dei ceppi di *P.multocida* eseguiti mediante tecnica Kirby-Bauer e MIC

Tabella 2 Susceptibility of *P. Multocida* strains using Kirby-Bauer and MIC methods

Dei 29 ceppi di *P.multocida* testati con la metodica Kirby-Bauer 17 risultano sensibili alla Tilmicosina pari al 65,2 % . Esaminando i risultati ottenuti mediante l'utilizzo della microdiluzione scalare, 29 dei 30 ceppi testati mostrano una MIC inferiore a 8 g/ml, 1 ceppo ha una MIC pari a 64 g/ml . Pertanto il 96,6% dei ceppi testati risulta essere sensibile alla Tilmicosina . Nella Tabella 3 sono riportati i numeri dei ceppi sensibili in funzione della MIC ottenuta

CONCENTRAZIONE	8 g/ml	4 g/ml	2 g/ml	1 g/ml	0,5 g/ml
N° CEPPI	2	12	4	7	4
PERCENTUALE %	6,9	41,4	13,8	24,1	13,8

Tabella 3 MIC dei 29 ceppi *M. multocida* sensibili
Table 3 MIC of *P. multocida* strains susceptible

Actinobacillus pleuropneumoniae

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati del test Kirby Bauer e MIC eseguiti per i ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae*

CEPPO	BIOTIPO	SIEROTIPO	KIRBY-BAUER	MIC
1	APP1	9a	R	2 g/ml
2*	APP1	9a	R	4 g/ml
3	APP1	9	R	2 g/ml
4	APP1	7	R	2 g/ml
5	APP1	9a	R	4 g/ml
6	APP1	5	R	2 g/ml
7	APP1	9a	R	>64 g/ml
8	APP1	9a	R	2 g/ml
9	APP1	9a	R	2 g/ml
10	APPP1	2	R	2 g/ml
11	APP1	2	R	2 g/ml
12	APP2	9	S	2 g/ml
13	APP1	9a	R	4 g/ml
14	APP2	2	R	4 g/ml
15	APP1	9	R	4 g/ml
16*	APP1	2	R	>64 g/ml
17	APP2	7	S	1 g/ml
18	APP1	2	R	4 g/ml
19	APP1	7	R	2 g/ml

Tabella 4 Risultati dei test di sensibilità dei ceppi di *A.pleuropneumoniae* eseguiti mediante tecnica Kirby-Bauer e MIC

Tabella 4 Susceptibility of *A.pleuropneumoniae* strains using Kirby-Bauer and MIC methods

2 dei 19 (10,5 %) ceppi di *A.pleuropneumoniae* testati mediante la metodica Kirby-Bauer sono risultati sensibili alla tilmicosina pari al. I risultati ottenuti mediante l'utilizzo della MIC indicano come 17 ceppi testati pari all'89,5 % sono da considerare sensibili. Nella Tabella 5 sono riportati i numeri dei ceppi di *A.pleuropneumoniae* sensibili in funzione della MIC ottenuta

CONCENTRAZIONE	4 g/ml	2 g/ml	1 g/ml
N° CEPPI	6	10	1
PERCENTUALE %	35,3	58,8	5,9

Tabella 5 MIC dei 17 ceppi di *A.pleuropneumoniae* sensibili
Table 5 MIC of *A.pleuropneumoniae* strains susceptible

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La valutazione della sensibilità in vitro dei ceppi di *P.multocida* e *A pleuropneumoniae* isolati in episodi di malattia respiratoria viene eseguita normalmente mediante test Kirby Bauer considerando i principali antimicrobici utilizzati nei programmi terapeutici. Vi sono situazioni in cui può risultare utile approfondire ulteriormente in campo ed in laboratorio tali risultati. La ripetuta segnalazione di un'efficacia di tilmicosina in allevamento in episodi in cui erano stati isolati ceppi risultati resistenti in vitro ha indotto a considerare la determinazione della MIC mediante metodi di diluizione e il monitoraggio periodico delle sensibilità di questi ceppi. Il confronto delle due metodiche Kirby Bauer e MIC indica che per *P.multocida*, nella maggior parte dei ceppi (15/29) vi è il medesimo risultato. Tuttavia in un certo numero di ceppi (13) si rileva discordanza tra le due metodiche con netta prevalenza della categoria di ceppi resistenti a Kirby Bauer e con MIC sensibili.

Per quanto riguarda i ceppi di *A.pleuropneumoniae* si rileva una discordanza superiore tra le due tecniche.

15 ceppi risultati resistenti con tecnica Kirby-Bauer hanno evidenziato una MIC molto bassa confermando il risultato ottenuto in campo con il trattamento. In queste situazioni è importante seguire un protocollo per verificare l'efficacia della tilmicosina nel tempo affiancando alla metodica Kirby-Bauer la MIC e il costante raffronto con l'efficacia in campo. Inoltre è indispensabile approfondire la reale situazione di campo procedendo a testare più ceppi aziendali mediante MIC ed in caso di sensibilità controllare nel tempo l'efficacia di tilmicosina in allevamento. In ogni caso, la determinazione della MIC mediante metodi di diluizione e il monitoraggio periodico delle sensibilità di questi ceppi sono le basi tecniche per giustificare e mantenere un tale programma terapeutico aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Pijoan C. (2006) "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing, chapter 43
2. Gottschalk M. & Taylor D.J. (2006) "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing, chapter 33
3. Paradis M.A., Higgins R., Larivière S., De Lasalle F., Wilson J., Dick P. (2002) "In-vitro antimicrobial activity of tilmicosin against field swine pathogens" Proceedings of the 17th IPVS Congress, 2002, Ames, Iowa, USA, paper 216
4. Mortimer I., Kongsted K. (2002) "Elimination of APP and mycoplasma from a 360 sow danish pig farm" Proceedings of the 17th IPVS Congress, 2002, Ames, Iowa, USA, paper 401
5. Anonimous (2002) "M31-A2 Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard – 2nd edition" NCCLS Vol 22 n°6