

SENSIBILITÀ DI CEPPI SPAGNOLI CLINICI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* AGLI ANTIBIOTICI

SENSITIVITY OF SPANISH CLINICAL ISOLATES OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE TO ANTIBIOTICS

ARGÜELLO H., CARVAJAL A., ALLER L.M., DIAZ J., RUBIO P.

*Dipartimento di Salute Animale, Unità di Malattie infettive ed Epidemiologia,
Facoltà di Medicina Veterinarie, Università di León, Spagna.*

Parole chiave: *Brachyospira hyodysenteriae*, sensibilità antimicrobica, dissenteria suina

Key words: *Brachyospira hyodysenteriae*, antimicrobial susceptibility, Swine dysentery

Riassunto

Questo studio valuta la sensibilità antibiotica di *Brachyospira hyodysenteriae*, l'agente eziologico della dissenteria suina (SD), a sei antibiotici (tilosina, tilvalosina, tiamulina, valnemulina, lincomicina e doxiciclina) disponibili in commercio per il trattamento dell'infezione. Sono stati testati mediante microdiluizione in brodo 60 ceppi di *Brachyospira hyodysenteriae*, prelevati nel corso del 2010 e 2011. Dai risultati ottenuti, per le pleuromutiline sono stati ottenuti valori di MICs simili a quelli di studi precedenti, e sono stati osservati un 20% e 40% di ceppi con sensibilità ridotta alla tiamulina ed alla valnemulina, rispettivamente. Tutti i ceppi erano resistenti alle massime concentrazioni testate per la tilosina, un antibiotico che in Spagna viene scartato per il trattamento della SD; diversamente, l'altro macrolide testato, la tilvalosina, presentava buoni risultati, in quanto tutti i ceppi sono risultati sensibili alle concentrazioni usate nel mangime. Infine, la sensibilità alla lincomicina è risultata simile a quella dei risultati precedentemente ottenuti in Spagna, e circa il 40% dei ceppi mostravano una sensibilità ridotta a questa lincosamide. Questo studio dimostra che l'analisi della sensibilità antibiotica riveste massima importanza ai fini della selezione dell'antibiotico, e della relativa concentrazione utilizzata per il controllo della dissenteria suina.

Abstract

The present study evaluates the antimicrobial susceptibility of *Brachyospira hyodysenteriae*, the etiological agent of swine dysentery (SD), to six antimicrobials (tylosin, tylvalosin, tiamulin, valnemulin, lincomycin and doxycycline) available for the treatment of the infection. 60 isolates of *B. hyodysenteriae* collected during 2010 and 2011 were tested by broth microdilution. By the results obtained, similar MICs values to previous studies were obtained for pleuromutilins with 20% and 40% of isolates with reduced susceptibility to tiamulin and valnemulin. All the isolates were resistant to the highest concentrations tested for tylosin, antimicrobial which is discarded in the SD treatment in Spain, while the other macrolide tested, the tylvalosin, yielded good results, being all the isolates susceptible to the concentrations used in feed. Finally susceptibility to lincomycin remained similar to previous results in Spain with almost 40% of the isolates with decreased susceptibility to this lincosamide. The study demonstrates that testing antimicrobial susceptibility is of paramount importance in the selection of the antimicrobial and the concentration used to control swine dysentery.

INTRODUZIONE

La Dissenteria dei suini (SD) è una grave colite muco-emorragica derivante dalla colonizzazione del grosso intestino dei suini a opera di *Brachyspira hyodysenteriae*, una spirocheta considerata il principale patogeno gastrointestinale della produzione suina (Hampson et al., 2006). Il controllo e il trattamento della SD prevedono l'utilizzo di antimicrobici, essendo la tiamulina, valnemulina, tilosina, tilvalosina e lincomicina i farmaci più comunemente usati a questo scopo nell'Unione europea (UE) (Hampson et al., 2006). Tuttavia, la comparsa di ceppi di *B. hyodysenteriae* con sensibilità ridotta ad uno o più di questi antibiotici è stata recentemente riportata in diversi paesi (Karlsson et al., 2001, Rohde et al., 2004) e complica il controllo di questa malattia.

La ricerca qui riportata, indica la sensibilità *in vitro* di ceppi di campo spagnoli di *B. hyodysenteriae* a vari farmaci comunemente usati per il trattamento e controllo della SD.

MATERIALI E METODI

Selezione ed isolamento dei ceppi batterici

Lo studio è stato effettuato a partire dalla valutazione di 60 ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* raccolti tra il 2010 e il 2011. I ceppi sono stati ottenuti dalla diagnosi routinaria di alterazioni gastrointestinali dei suini, effettuata dal nostro gruppo di ricerca presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di León.

L'isolamento è stato effettuato nei casi sospetti di dissenteria a partire da campioni di feci, tramite la normale procedura di isolamento su terreni selettivi (Jenkinson e Wingar, 1981) ed identificazione dei ceppi emolitici con PCR (Rasback et al., 2006).

Determinazione della resistenza antibiotica

La sensibilità agli antibiotici di questi 60 ceppi di *B. hyodysenteriae* è stata determinata per mezzo di una tecnica di diluizione in terreno liquido su piastre a 96 pozzetti, sulla base del metodo descritto da Karlsson et al. (2003), che è il metodo più internazionalmente accettato per questa determinazione.

Sono state utilizzate diluizioni doppie in serie di ogni antibiotico secondo i seguenti intervalli di concentrazione: tiamulina (0,063-8 µg / ml), valnemulina (0,031-4 µg / ml), doxiciclina (0,125-16 µg / ml), tilvalosina (0,25-32 µg / ml), lincomicina (0,5-64) e tilosina (2-128 µg / ml). Le concentrazioni di antibiotici indicate corrispondono a quelle riconosciute a livello internazionale per la determinazione della sensibilità di *B. hyodysenteriae* agli antibiotici. In questo modo, è stata determinata la concentrazione minima inibente (MIC) di ciascun antibiotico per ogni ceppo. Allo stesso modo, sono stati ottenuti i valori di MIC che inibiscono la crescita del 90% e del 50% dei ceppi, dette CMIC90 e MIC50 rispettivamente.

RISULTATI

I risultati ottenuti per ognuno dei sei antibiotici testati sono illustrati nella figura 1:

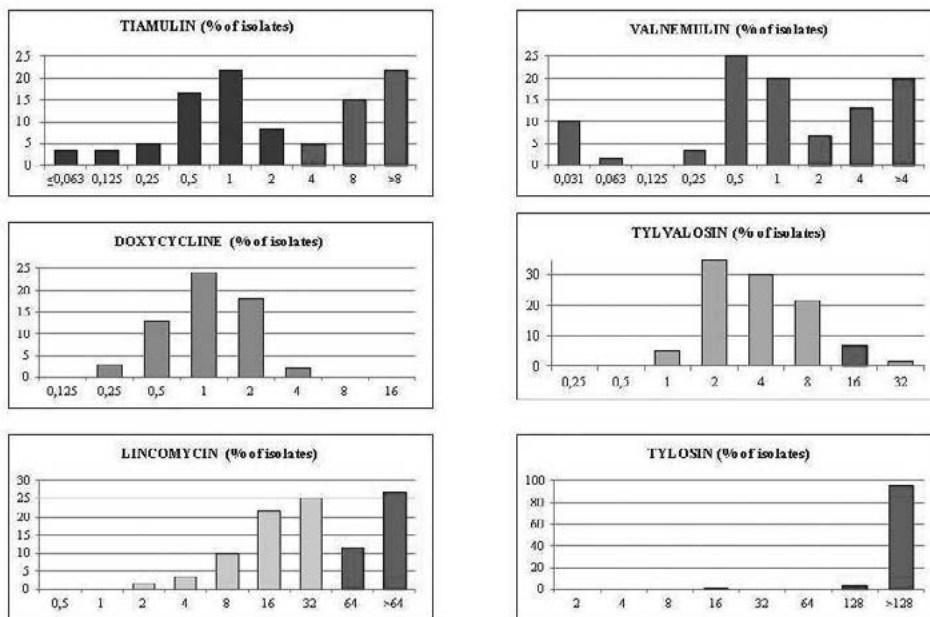


Figura 1. Distribuzione delle MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) di sei antimicrobici per 60 ceppi di campo spagnoli di *B. hyodysenteriae* raccolti nel corso del 2010 e del 2011. Le colonne rosse rappresentano le concentrazioni alle quali i ceppi sono considerati a ridotta sensibilità.

Figure 1. Distribution of MICs ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of six antimicrobials for 60 Spanish field isolates of *B. hyodysenteriae* recovered during 2010 and 2011. The red bars represent concentrations at which the strains are considered with reduced susceptibility.

La MIC_{50} di un gruppo di ceppi batterici per un antibiotico è definita come la concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita del 50% dei ceppi che compongono il gruppo. Analogamente, la MIC_{90} di un antibiotico per un gruppo di ceppi batterici è la concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita del 90% dei ceppi nel gruppo. La MIC_{50} e la MIC_{90} degli antibiotici testati nei confronti di questi 60 ceppi sono presentati nella Tabella 1:

	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Tiamulina	1	8
Valnemulina	1	4
Doxicilina	1	2
Tilvalosina	4	8
Lincomicina	16	64
Tilosina	>128	>128

Tabella 1. MIC₅₀ e MIC₉₀ per i sei antimicrobici selezionati nei 60 ceppi di *B. hyodysenteriae* inclusi nello studio.

Table 1. MIC₅₀ and MIC₉₀ for the six antimicrobials selected in the 60 *B. hyodysenteriae* isolates included in the study.

La tabella 2 mostra la percentuale di ceppi resistenti alle concentrazioni usate nei mangimi, che sono correlate alle concentrazioni che vengono raggiunte nel colon in base ai calcoli stabiliti da Burch et al. (Burch et al, 2005.):

Table 2 shows percentage of resistant isolates at the concentrations used in feed which are correlated with concentrations that these reach in the colon by the calculations established by Burch and colleagues (Borch et al., 2005):

	ppm nell'alimento ppm in feed	µg/g (ppm) nel colon µg/g (ppm) nel colon	N° di ceppi (%) con MIC>concentrazione nel colon No of isolates (%) with MIC>concentration in colon
Tiamulina	220	8	13 (21.6%)
Valnemulina	75	1.68	24 (40%)
Doxicilina	-	-	-
Tilvalosina	85	32	0 (0%)
Lincomicina	110	34.5	23 (38.3%)
Tilosina	200	100	60 (100%)

Tabella 2. Percentuale di ceppi resistenti ai sei antibiotici testate alle concentrazioni utilizzate nell'alimento e loro relativa efficacia calcolata nel colon.

Table 2. Percentage of isolates with resistant to the six antimicrobials tested at the concentrations used in feed and their calculated efficiency in colon

DISCUSSIONE:

La diminuzione della sensibilità agli antimicrobici di uso comune nel trattamento della dissenteria suina è stato riportato da precedenti studi spagnoli (Hidalgo et al., 2009; 2011), ed anche in studi simili effettuati in altri Paesi (Molnar, 1996. Karlsson et al., 2001, 2003; Lobova et al., 2004; Rohde et al., 2004). Dai risultati ottenuti in questi studi si deduce che la determinazione dei valori di MIC mediante prove antimicrobiche è di grande importanza per il successo del trattamento stabilito per il controllo della SD.

Nello studio sono stati inclusi quattro gruppi di antimicrobici (quelli disponibili per il trattamento della malattia). Le pleuromutiline, tiamulina e valnemulina, hanno dimostrato risultati MIC simili a quelli riportati da ceppi degli anni 2008 e 2009 (Hidalgo et al., 2011). La MIC₉₀ ha raggiunto 8 µg / ml per la tiamulina e 4 µg / ml per valnemulina, mentre la MIC₅₀ per entrambi i farmaci è stata di 1 µg/ml, con un incremento di almeno 4 volte rispetto alle MIC₅₀ dei ceppi di campo raccolti negli anni 2000-2007 (Hidalgo et al., 2009). Risultati simili sono stati riportati in Germania per 71 e 40 ceppi di campo di *B. hyodysenteriae* raccolti nel 2000 e nel 2001, rispettivamente (Rode et al., 2004). Tuttavia, molti dei ceppi di campo spagnoli presentavano MICs più elevate per la tiamulina e la valnemulina rispetto a quelle riportate da Rohde et al. (Rode et al., 2004), ed erano simili a quelle di ceppi tedeschi ed inglesi per i quali le MIC della tiamulina erano particolarmente elevate, come riportato da Karlsson et al. (2004).

Il 100% dei ceppi testati sono risultati resistenti alla concentrazione MIC raggiunta nel colon mediante l'uso di 200 ppm di tilosina, mostrando che la diminuita sensibilità dei ceppi spagnoli di *B. hyodysenteriae* a questo macrolide è diffusa. Sebbene la tilvalosina sia un derivato della tilosina, ha mostrato una distribuzione molto più sensibile rispetto a tilosina. La distribuzione dei ceppi nei confronti della tilvalosina era unimodale con un picco a 2 µg /ml. In accordo con i valori di breakpoint clinici suggeriti (Burch et al., 2005), la tilvalosina può essere utile nel trattamento della dissenteria suina in Spagna; nessuno dei ceppi testati ha presentato una diminuzione della sensibilità, mentre l'uso della tilosina non è chiaramente consigliabile. La distribuzione della lincomicina ha mostrato che la metà dei ceppi isolati erano vicino (sotto o sopra) al break point clinico selezionato ed un 25% dei ceppi sono inoltre cresciuti alla massima concentrazione testata (> 64mg/ml). I valori di MIC di questi antibiotici sono rimasti simili a quelli riportati da studi precedenti (Hidalgo et al., 2011) nonostante sino stati frequentemente usati per il controllo della SD. Le tetracicline (doxiciclina) possono essere usate in combinazione con le pleuromutiline per il controllo della SD ma le ricerche riguardo i break points o la sensibilità sono limitate rispetto ad altri antibiotici utilizzati in questo studio.

CONCLUSIONI

Il presente studio conferma le ricerche precedentemente effettuate sulla sensibilità antimicrobica di *B. hyodysenteriae*. L'analisi della sensibilità antibiotica è di massima importanza per determinare la scelta dell'antibiotico ma anche per limitare lo sviluppo di resistenza, modulando la concentrazione somministrata. È stato dimostrato un aumento della resistenza alle pleuromutiline, oltre ad una mancanza di efficacia della tilosina nei confronti della SD. Diversamente, la tilvalosina, un altro macrolide, risulta utile per il trattamento della SD, in quanto nessuno dei ceppi testati superava i limiti di sensibilità stabiliti. Nonostante l'uso comune delle lincosamidi nei trattamenti di campo, non vi è un aumento della resistenza a questo antibiotico, anche se, confrontandolo con ricerche eseguite in precedenza, molti ceppi sono oggi vicini alla concentrazione stimata per il breakpoint.

BIBLIOGRAFIA

Burch D.G. S. (2005). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations. *Pig J.* 56:8–24.

Hampson D.J, Fellstrom, C., Thomson J.R. (2006). Swine dysentery B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. D'Allaire (Eds.) *et al.*, Diseases of Swine (ninth ed.), Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA (2006), pp. 785–805.

Hidalgo A., Carvajal A., García-Feliz C., Osorio J., Rubio P. (2009) Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res Vet Sci.* 2009 Aug;87(1):7-12.

Hidalgo Á., Carvajal A., Vester B., Pringle M., Naharro G., Rubio P. (2011). Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3330-3337.

Jenkinson S.R., Wingar C.R. (1981). Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec.* 109(17):384-385.

- Karlsson M., Gunnarsson A., Franklin A. (2001). Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev.* 2:59–65.
- Karlsson M., Fellstrom C., Gunnarsson A., Landen A., Franklin A. (2003). Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates *Journal of Clinical Microbiology*, 41:2596–2604.
- Karlsson M., Aspán A., Landén A., Franklin A. (2004). Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53:281–285.
- Lobova D., Smola J., Cizek A. (2004). Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* *Journal of Medical Microbiology*, 53 (2004), pp. 287–291.
- Molnar L. (1996). Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemotherapeutic drugs *Vet. Rec.* 138:158–160
- Råsbäck T., Fellström C., Gunnarsson A., Aspán A. (2006). Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J. Microbiol. Methods* 66:347–353
- 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.