

ANTIMICROBICO-SENSIBILITÀ DI CEPPI DI *GLAESSERELLA PARASUIS* ISOLATI DA SUINI COMMERCIALI DAL 2017 AL 2022

ANTIMICROBIAL-SENSITIVITY OF *GLAESSERELLA PARASUIS* STRAINS ISOLATED FROM COMMERCIAL PIGS FROM 2017 TO 2022

CORDIOLI B., RIZZARDI A., GUOLO A., PALAZZOLO L. GARBUIO M., DRIGO I., VIEL L., BANO L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di batteriologia speciale, sezione di Treviso

Parole chiave: *Glaesserella parasuis*, antimicrobico-sensibilità, MIC

Keywords: *Glaesserella parasuis*, antimicrobial-susceptibility, MIC

RIASSUNTO

La malattia di Glässer è una patologia a diffusione globale caratterizzata da polisierosite e artrite, sostenuta da *Glaesserella Parasuis* (GP). Date le limitate informazioni circa la sensibilità agli antimicrobici di questo microrganismo, soprattutto in Italia, con questo studio si è voluta indagare la sensibilità di 30 ceppi isolati da suini sintomatici provenienti da allevamenti veneti nel periodo 2017-2022 per fornire informazioni utili circa l'efficacia in vitro di 9 molecole rappresentative delle più comuni classi di antibiotici utilizzati in suinicoltura. La sensibilità è stata valutata attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), ottenuta mediante il metodo della microdiluizione in brodo. Ad eccezione dei sulfamidici potenziati (43% di ceppi resistenti) gli isolati sono risultati ampiamente sensibili ad ampicillina, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicolo e amoxicillina addizionata con acido clavulanico. Minime resistenze sono state registrate per tetraciclina e tilmicosina, rispettivamente 17 e 14% degli isolati, restando in linea con i profili di antimicrobico-sensibilità di altri paesi europei (Wissing *et al.*, 2001; Aarestrup *et al.*, 2004; Nedbalcova *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007). La mancanza di Break Point solidi e le molteplici localizzazioni del patogeno complicano l'interpretazione delle MIC, rendendo necessarie future misure profilattiche dirette e indirette alternative alla terapia antibiotica.

ABSTRACT

Glässer's disease is a global disease characterized by polysierositis and arthritis, caused by *Glaesserella Parasuis* (GP).

Since fewer studies were published about the antimicrobial-susceptibility of the pathogen, this study aimed to test the in vitro efficacy of 9 antibiotics used in pig farming on 30 strains isolated from symptomatic swines of Veneto farms between 2017 and 2022. The sensitivity was assessed by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), obtained by broth-microdilution.

Except for thrimethoprim/sulfamethoxazol (43% of resistant strains) the isolates were found to be widely susceptible to ampicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin-clavulate. In accordance with antimicrobial-susceptibility studies of other European countries fewer strains showed resistance to tetracycline (5) and tilmicosin (4) (Wissing *et al.*, 2001; Aarestrup *et al.*, 2004; Nedbalcova *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007). The lack of solid Break Points and the different localizations of the pathogen make the interpretation of the MIC values difficult. In the future it will be necessary to develop adequate direct and indirect prophylactic measures alternative to antibiotic therapy.

INTRODUZIONE

Glaesserella Parasuis (GP) (ex *Haemophilus parasuis*) è un bacillo Gram negativo NAD-dipendente, appartenente alla famiglia delle *Pasteurellaceae* e agente eziologico della malattia di Glässer. Ad oggi si conoscono 15 serovar (1-15) con caratteristiche di virulenza variabili, ma non si esclude che ne esistano delle altre, tra i numerosi ceppi che in molteplici studi sono risultati non tipizzabili (Luppi *et al.*, 2013; Howell *et al.*, 2015). Il patogeno può essere isolato dalle alte vie respiratorie di soggetti clinicamente sani (ceppi considerati “avirulenti” – serovar 3, 6, 7, 9, 11), ma anche rendersi responsabile di forme sistemiche (serovar 1, 2, 4, 5, 8, 12-15) (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992). Tra le forme cliniche si distinguono quadri iperacuti con morte improvvisa del soggetto in assenza di significative lesioni anatomopatologiche, quadri acuti caratterizzati da polisierositi, poliartriti e meningiti purulente e quadri cronici con fibrosi delle sierose (Aragon *et al.*, 2019). Le forme sistemiche sono spesso sporadiche e risultano epidemiologicamente associate a concomitanti infezioni virali da PRRS, PCV2 e virus influenzale e più frequenti nei soggetti di 4-12 settimane (Li *et al.*, 2009; Palzer *et al.*, 2015; Unterweger *et al.*, 2016).

Le strategie utili alla prevenzione della malattia di Glässer comprendono un buon management degli animali, una adeguata colostratura e la vaccinazione. L'efficacia di quest'ultima risente della circolazione di diverse serovar poiché non si evidenziano fenomeni di cross-protezione, di conseguenza la terapia antibiotica risulta essere ancora la prima scelta, in presenza della malattia (Macedo *et al.*, 2015).

Gli antimicrobici maggiormente utilizzati nei confronti della malattia di Glässer appartengono alle classi dei β -lattamici, fenicoli, macrolidi, tetracicline e sulfamidici potenziati. La possibilità di selezionare microrganismi resistenti in corso di terapia di GP rende necessario un uso prudente e responsabile del farmaco basato, oltre che su una diagnosi certa, sulla sensibilità del ceppo isolato nel focolaio (de la Fuente *et al.*, 2007; Karriker *et al.*, 2019). Con questo studio si è voluta indagare la sensibilità agli antimicrobici di questo microrganismo, viste le scarse informazioni a riguardo, soprattutto in Italia, con la finalità di fornire indicazioni utili relative alle classi di antibiotici utilizzati comunemente in suinocoltura.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti allo studio 30 ceppi selezionati tra quelli isolati tra il 2017 e il 2022, presso la Sezione Diagnostica di Treviso (IZSVe), e derivanti da esami batteriologici collaterali ad accertamenti anatomo-patologici di suini in svezzamento e magronaggio provenienti da allevamenti veneti. L'isolamento è avvenuto su terreni non selettivi da campioni di bronco (10), polmone (12), milza (1), pericardio (2), cervello (3), peritoneo (1) e articolazione (1) e ciascuno da allevamenti diversi o dallo stesso allevamento a distanza almeno di 6 mesi e da cicli differenti.

L'isolamento è avvenuto su terreno agar cioccolato incubato per 24-48 ore a 37° in condizioni di microaerofilia (5% CO₂) e l'identificazione dei ceppi è stata eseguita tramite MALDI TOF MS (Biotyper Microflex LT, Bruker Daltonics).

La sensibilità è stata valutata attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) di 9 antimicrobici, ottenuta mediante il metodo della microdiluizione in brodo. Sono stati testati amoxicillina addizionata con acido clavulanico (AUG2), ampicillina (AMP), ceftiofur (CEFT), enrofloxacin (ENRO), florfenicolo (FFN), spectinomycin (SPE), tetraciclina (TET), tilmicosina (TIL), trimethoprim/sulfametoxazolo (SXT) impiegando piastre commerciali (Sensititre, ThermoFisher Scientific).

La coltura in esame è stata stemperata in soluzione fisiologica per ottenere una sospensione di torbidità 0,8 McFarland necessaria all'inoculo dell'*Haemophilus Test Medium* (HTM) addizionato con 500 μ L di sangue lisato di cavallo (LHB). La piastra inocolata con 100

µL di sospensione batterica e incubato in condizioni di microaerofilia per 24-48h. Ogni antimicrobico è stato testato in diluizioni variabili da 0,0156 a 256 µg/ml.

RISULTATI

I valori di MIC degli antimicrobici testati sono riassunti in tabella 1. Le caselle bianche corrispondono alle concentrazioni di antimicrobico che sono state testate, mentre le caselle colorate di arancione sono indicative di concentrazioni testate unicamente nelle piastre antecedenti al 2022. Laddove disponibili, i break-point di resistenza sono indicati in tabella 1 tramite linee doppie verticali (de la Fuente *et al.*, 2007).

	0,075	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AUG2			18		5	4	1	1				1						0,0312	0,25
AMP	9		1	4	9	2	3	1		1								0,125	0,25
CEFT	16		3	2	2	3	2	2										<0,0156	0,25
ENRO	11		5	6	5	2		1										0,0312	0,125
FFN			2		4	13	2	4	3	2								0,25	1
SPE							1		3	5	2	8	3		4	3	1	16	128
TET			4*		5	8	4	2	2		3		2					0,25	2
TIL						2	2	2	5	6	7	1		1	1	2		4	8
SXT			2	1	1	4	1	4	4		5	4	3	1				2	8

* MIC<0.125 per 1 ceppo testato nel 2022

Tabella 1. Distribuzione dei ceppi di *G. parasuis* rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo testato (µg/ml.) e valori di MIC₅₀ e MIC₉₀.

Table 1. Distribution of *G. parasuis* strains according to the antimicrobial concentration tested (µg/ml.) and MIC₅₀ and MIC₉₀ value.

DISCUSSIONE

I risultati suggeriscono una diffusa sensibilità degli isolati nei confronti degli antimicrobici comunemente impiegati per il trattamento della malattia di Glässer.

Ampicillina, ceftiofur, enrofloxacin e florfenicolo si sono dimostrati ampiamente efficaci (96-100% di ceppi sensibili). Questo dato si presenta in linea con i risultati di antimicrobico-sensibilità relativi a ceppi isolati nel Regno Unito, Danimarca, Spagna e Repubblica Ceca, dove si sono evidenziate solo minime percentuali di ceppi resistenti al florfenicolo (Aarestrup *et al.*, 2004; Nedbalcova *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007).

Pur non essendo disponibile il breakpoint relativo all'amoxicillina addizionata con acido clavulanico, la distribuzione dei ceppi rispetto alle diverse concentrazioni di principio attivo lascia supporre una diffusa sensibilità con il 60% ceppi (18) inibito da concentrazioni di antimicrobico inferiori a quella più bassa testata (0,0625 µg/ml).

I ceppi considerati presentano una distribuzione bimodale per quanto riguarda la spectinomycin con 7 ceppi oltre il breakpoint di sensibilità. Questo dato è concorde con quanto per i ceppi di GP isolati in Spagna tra il 2002 e il 2004, ma si discosta rispetto ai risultati di Aarestrup e colleghi (2004) su ceppi danesi.

Per quanto riguarda tetraciclina e tilmicosina i ceppi presentano una distribuzione gaussiana all'interno del range di diluizioni testate con percentuali di resistenza rispettivamente del 17 e 14% e valori di MIC₉₀ uguali o inferiori rispetto ai dati riportati in letteratura (de la Fuente *et al.*, 2007, Dayao *et al.*, 2014).

Il trimethoprim/sulfametoxazolo è l'unico principio attivo per cui si è evidenziata ampia

diffusione di ceppi resistenti (43% degli isolati), fenomeno descritto anche in ceppi isolati in Spagna e in Svizzera, questi ultimi testati con metodo di disco-diffusione (Wissing et al., 2001; de la Fuente et al., 2007). Gli isolati italiani, però, presentano valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ più elevati rispetto a quanto riportato da de la Fuente (2007) e Dayao (2014) e colleghi. Le minime differenze in termini di resistenza riscontrate tra i ceppi italiani e quelli esteri possono derivare dal diverso management degli animali (es: durata del ciclo produttivo e genetica utilizzata) con conseguenti differenze nei protocolli terapeutici.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano una diffusa sensibilità, *in vitro*, dei ceppi Italiani rispetto ai principi attivi testati. L'indisponibilità di Break Point solidi per tale microorganismo, rende l'interpretazione del valore di MIC comunque complicata, anche alla luce delle molteplici localizzazioni del patogeno rispetto alle proprietà di distribuzione dei diversi principi attivi. Future alternative alla terapia antibiotica non possono che passare attraverso pratiche di profilassi diretta e indiretta molto stringenti e queste ultime non possono prescindere dalle caratteristiche antigeniche (serovar in primis) dei ceppi circolanti nel focolaio.

BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., & Angen, Ø. (2004). "Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark". *Veterinary microbiology*, 101(2), 143-146.
2. Aragon V., Segalés J., Tucker A.W. (2019) "Glässer's Disease", *Diseases of swine*, 844-853
3. Dayao, D. A. E., Kienzle, M., Gibson, J. S., Blackall, P. J., & Turni, C. (2014). "Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*". *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 586-589.
4. de la Fuente, A. M., Tucker, A. W., Navas, J., Blanco, M., Morris, S. J., & Gutiérrez-Martín, C. B. (2007). "Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain". *Veterinary microbiology*, 120(1-2), 184-191.
5. Howell K.J., Peters S.E., Wang J., Hernandez-Garcia J., Weinert L.A., Luan S.L., Chaudhuri R.R., Angen Ø., Aragon V., Williamson S.M., Parkhill J., Langford P.R., Rycroft A.N., Wren B.W., Maskell D.J., Tucker A.W. (2015) "Development of a multiplex PCR for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*". *J. Clin. Microbiol.*, 9, pp. 01915-01991.
6. Karriker, L. A., Coetzee, J. F., Friendship, R. M., & Apley, M. D. (2019). "Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis". *Diseases of swine*, 158-170.
7. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. (1992) "Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts". *J Clin Microbiol.* Apr;30(4):862-5. doi: 10.1128/jcm.30.4.862-865.
8. Li JX, Jiang P, Wang Y, Li Y, Chen W., Wang X, Li P. (2009). "Genotyping of *Haemophilus parasuis* from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens" *Prev Vet Med* 91:274-279.
9. Macedo, N., Rovira, A., & Torremorell, M. (2015). "Haemophilus parasuis: infection, immunity and enrofloxacin". *Veterinary research*, 46(1), 1-6.
10. Nedbalcova, K., Satran, P., Jaglic, Z., Ondriasova, R., & Kucerova, Z. J. V. M. (2006). "Haemophilus parasuis and Glässer's disease in pigs: a review". *Veterinari Medicina*, 51(5), 168-179.
11. Palzer A, Haedke K, Heinritz K, Zoels S., Ladinig A, and Ritzmann M. (2015).

- “Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis” *Can Vet J* 56:285–287.
12. Unterweger C, Wöchtl B, Spargser J, Brunthaler R, Untersperger M, Lillie-Jaschniski K, Dürrwald R, Hennig-Pauka I (2016). “Influenza outbreak in weaners with involvement of *Mycoplasma hyorhinis* and *Haemophilus parasuis*”. A case report *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 44:259–265.
 13. Wissing A, Nicolet J, Boerlin P. (2001) “The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine” *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. Oct;143(10):503-510. PMID: 11680911.