

**SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI DI ISOLATI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* e *BRACHYSPIRA PILOSICOLI* DA CASI DI ENTERITE DEL MAGRONAGGIO-INGRASSO IN ALLEVAMENTI ITALIANI**

***ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE AND BRACHYSPIRA PILOSICOLI ISOLATES FROM CASES OF ENTERITIS OF FATTENERS AND GROWERS IN ITALIAN SWINE HERDS***

MAGISTRALI, C.F., CUCCO, L., D'AVINO, N., PANICCIA', M., NERI, MC., PEZZOTTI, G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy;*

**PAROLE CHIAVE:** MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, metodo, breakpoint  
**KEY WORDS:** MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, method, breakpoint

**RIASSUNTO**

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la sensibilità agli antimicrobici di isolati di *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* da casi di enterite del magronaggio e ingrasso in allevamenti italiani. Gli isolati sono stati ottenuti attraverso due diversi metodi di campionamento: attivo, da suini affetti da dissenteria suina, e passivo, dalle collezioni batteriche di laboratori diagnostici. Il campionamento attivo ha interessato 39 allevamenti a diverso indirizzo produttivo, dai quali sono stati caratterizzati 30 ceppi di *B. hyodysenteriae* e 9 ceppi di *B. pilosicoli*. Attraverso il campionamento passivo sono invece stati esaminati 27 stipiti di *B. hyodysenteriae*. Tutti i ceppi sono stati testati attraverso il metodo di diluizione in brodo. I risultati hanno mostrato una diffusa resistenza a tilosina, sia dal campionamento attivo sia da quello passivo, mentre la maggior parte degli stipiti ha mostrato esito intermedio per lincomicina. Per quanto riguarda le pleuromutiline, tiamulina e valnemulina, nessun ceppo di *B. hyodysenteriae* del campionamento attivo è risultato resistente. La presenza di ceppi di *B. hyodysenteriae* multi - resistenti è stata confermata attraverso il campionamento passivo. Dei 9 ceppi di *B. pilosicoli*, 3 sono risultati resistenti anche alle pleuromutiline. Le differenze riscontrate tra campionamento attivo e passivo possono essere giustificate dalle diverse modalità di selezione del campione, dal momento che i casi pervenuti al laboratorio diagnostico sono generalmente caratterizzati da problematiche ricorrenti dissenteria suina.

**ABSTRACT**

The aim of this study was to assess antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from cases of enteritis of growers and fatteners from Italian pig herds. *B. hyodysenteriae* isolates were from two different sampling procedures: active sampling, from swine affected by enteritis, and passive sampling, from culture collections of diagnostic laboratories. Thirty isolates of *B. hyodysenteriae* and 9 isolates of *B. pilosicoli* were collected from 39 herds, of different holding types, by active sampling, while 27 were from passive sampling. All isolates were tested for antimicrobial susceptibility by a broth dilution

method. Results showed a widespread resistance to tylosin of the isolates from both active and passive sampling, while most of them resulted intermediate to lincomycin. Regarding pleuromutilins, tiamulin and valnemulin, no *B. hyodysenteriae* isolate from active sampling resulted resistant, but the presence of multi-resistant strains was confirmed by passive sampling. Three out of nine isolates of *B. pilosicoli* resulted resistant to pleuromutilins. Differences between active and passive sampling may be due to a selection of isolates by passive sampling, since they originated from farms with recurrent SD problems.

## **INTRODUZIONE**

*Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente della dissenteria suina (Swine Dysentery, SD), una patologia ben conosciuta, che tuttavia causa ancora notevoli danni economici negli allevamenti suini italiani. La spirochetosi intestinale suina, o Porcine intestinal Spirochetosis (PIS), sostenuta da *B. pilosicoli*, è stata segnalata in Italia, e si caratterizza per una minore gravità clinica (Bonilauri, 2004). 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, 2003; Karlsson, 2004; Bonilauri, 2004). In questo contesto, è importante valutare l'andamento della sensibilità agli antimicrobici di questa specie batterica.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare quindi la sensibilità agli antimicrobici di stiptipi di *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* isolati da allevamenti suini italiani. Gli isolati sono stati ottenuti con due diverse modalità di campionamento: un campionamento attivo, svolto nelle aziende che presentavano sintomi indicativi di dissenteria suina, e un campionamento passivo, che ha interessato invece ceppi di *B. hyodysenteriae* provenienti dalle collezioni batteriche di laboratori diagnostici italiani. Tutti gli isolati sono stati valutati per la sensibilità agli antimicrobici mediante rilievo della minima concentrazione inibente (MIC) con lo stesso metodo, di diluizione in brodo.

## **MATERIALI E METODI**

Campionamento passivo: ventisette 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.

Campionamento attivo: sono stati campionati 39 allevamenti di diverso indirizzo produttivo; contestualmente al prelievo di feci è stato compilato un questionario anamnestico, che ha raccolto dati relativi alla composizione dell'azienda e al gruppo di suini campionato, con particolare riferimento alla sintomatologia riscontrata e al tipo di trattamenti effettuato. Il 28% degli allevamenti era a ciclo aperto, il 33% di solo ingrasso, e il 39% a ciclo chiuso. Il numero medio di scrofe per allevamento era di 600, sia per il ciclo aperto sia per quello chiuso, mentre negli allevamenti all'ingrasso, il numero medio di suini era di 2550 l'anno. Per

quanto riguarda i trattamenti, nel 54% delle aziende, erano state impiegate pleuromutiline nella fase interessata dal campionamento o in quelle precedenti.

Calcolando una prevalenza attesa del 30%, è stato suggerito il prelievo di 9 campioni di feci da ciascun allevamento, da suini con sintomi suggestivi di SD o ospitati nello stesso box. I campioni di feci (n=342), mantenuti in condizioni di refrigerazione fino al momento dell'analisi, sono stati poi seminati su TSA-BJ agar a 41,5°C per cinque giorni in anaerobiosi. Le piastre che presentavano una crescita caratterizzata da emolisi sono state sottoposte a isolamento su Agar Sangue al 5% per 3-5 giorni a 41,5°C in anaerobiosi. Gli stipiti, dopo verifica della purezza in microscopia ottica, sono stati infine caratterizzati mediante PCR (Leser, 1997) per la definizione di specie. Gli isolati appartenenti alla specie *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* sono stati quindi sottoposti a test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici con metodo di diluizione in brodo, come descritto oltre. Per ogni allevamento positivo, è stato sottoposto al test almeno un isolato appartenente a ciascuna delle due specie.

**Metodo di diluizione in brodo:** è stato eseguito in conformità a quanto già descritto da Rohde (2004). In breve, ciascun isolato è stato seminato su Anaerobe Fastidious Agar (LAB-M Ltd, UK) in anaerobiosi a 41,5°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 quattro giorni con agitazione continua. Un ceppo di *Brachyspira hyodysenteriae* (ATCC 27164, B78) è stato impiegato come controllo (Pringle, 2006a). 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.

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: ≤ 1 µg/ml: sensibile; >1- ≤4 µg/ml: intermedio; >4 µg/ml: resistente. Valnemulina: ≤ 1 µg/ml: sensibile; >1- ≤4 µg/ml: intermedio; >4 µg/ml: resistente. Lincomicina: ≤ 4 µg/ml, sensibile; >4- ≤36 µg/ml: intermedio; >36 µg/ml: resistente.

## RISULTATI

**Campionamento attivo:** in 23 su 39 allevamenti esaminati (pari al 59,0%) è stata isolata *B. hyodysenteriae*; in 3 (7,7%) *B. pilosicoli*, mentre in un solo caso (2,6%) si sono isolate entrambe le specie. Per quanto riguarda i campioni di feci, 209 (61,1%) sono risultati positivi per *Brachyspira* spp. Da questi campioni sono stati isolati 184 stipiti, che alla caratterizzazione in PCR sono risultati appartenere alla specie *B. hyodysenteriae* (108, pari al 58,7%), mentre 11 (6,0 %) alla specie *B. pilosicoli* e 108 (51,2%); 65 isolati (35,3%) non sono invece risultati tipizzabili mediante PCR.

Esiti della valutazione della minima concentrazione inibente: in tabella 1 sono indicati i valori relativi agli esiti dei ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da campionamento attivo, mentre in tabella 2 sono riportati quelli relativi a *B. pilosicoli* sempre da campionamento attivo.

Infine, gli esiti delle determinazioni che si riferiscono ai ceppi di *B. hyodysenteriae* da campionamento passivo sono indicati in tabella 3.

**Tabella 1:** valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* da campionamento attivo (n=30). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.

**Table 1:** MIC values of *B. hyodysenteriae* isolates from active sampling by Broth Dilution Method (n=30). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are shown in bold.

Valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )														
Antibiotico	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Tiamulina	2		6			7	11	4						
Valnemulina	3	4	2	1	3	8	9							
Lincomicina								1	5	4	6	<b>14</b>		
Tilosina													<b>1</b>	<b>29</b>

**Tabella 2:** valori di MIC degli isolati di *B. pilosicoli* da campionamento attivo (n=9). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.

**Table 2:** MIC values of *B. pilosicoli* isolates from active sampling (n=9). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.

Valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )													
Antibiotico	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Tiamulina	1		1			1	2	1	<b>3</b>				
Valnemulina	1	1		1	1	1	1	<b>3</b>					
Lincomicina								2	3	1	3		
Tilosina							1		1	<b>6</b>			

**Tabella 3:** valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* da campionamento passivo (n=27). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.

**Table 3:** MIC values of *B. hyodysenteriae* isolates from passive sampling (n=27). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.

Valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )														
Antibiotico	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Tiamulina	1		2	6	2	5	5	1	<b>5</b>					
Valnemulina	3	1	2	1	6	1	5	<b>8</b>						
Lincomicina						1	1	6	6	4	2	<b>7</b>		
Tilosina							2						<b>1</b>	<b>24</b>

## DISCUSSIONE

L'elevata percentuale di allevamenti positivi per *B. hyodysenteriae* o *B. pilosicoli* conferma il buon potere predittivo dell'esame clinico per la diagnosi delle infezioni da *Brachyspira* spp. Per quanto riguarda la composizione di specie, *B. hyodysenteriae* appare essere maggiormente frequente rispetto a *B. pilosicoli*. Questo rilievo ricalca quanto già osservato in precedenza da altri autori in allevamenti italiani (Magistrali, 2005; Merialdi, 2002), anche se non è escluso che la maggiore gravità della sintomatologia osservabile in corso di dissenteria suina renda l'infezione da *B. hyodysenteriae* più facilmente rilevabile rispetto a *B. pilosicoli*.

In corso di dissenteria suina, inoltre, il numero di animali che effettivamente eliminano il batterio attraverso le feci appare essere piuttosto elevato, come confermato dall'elevata percentuale di campioni positivi all'esame batteriologico. Questo dato può essere d'aiuto qualora si desideri confermare il sospetto clinico contenendo i costi dell'accertamento diagnostico.

I dati che si riferiscono alla sensibilità agli antimicrobici rilevano la presenza di una diffusa resistenza a tilosina, che conferma quanto già accertato da altri autori (Ronne e Szancer, 1990; Molnar, 1996; Karlsson, 2003; Bonilauri 2004, Molnar, 1996), probabilmente legato ad un diffuso impiego di questa molecola in suinicoltura. La resistenza a tilosina è legata a una mutazione puntiforme del gene che codifica il 23S rRNA, ed insorge rapidamente in vitro, dopo 2 settimane circa di esposizione all'antimicrobico (Karlsson, 2003). Per quanto riguarda invece lincomicina, la maggior parte degli isolati testati si colloca su valori di sensibilità intermedia, con presenza di stipiti chiaramente resistenti o sensibili sia in campionamento attivo che passivo. Diverso il quadro che si riferisce alle pleuromutiline, vale a dire valnemulina e tiamulina. Innanzitutto, la sensibilità ai due antimicrobici cammina in parallelo: ceppi chiaramente sensibili a tiamulina lo sono anche a valnemulina e viceversa. Per quanto riguarda *B. pilosicoli*, nonostante il numero basso d'isolati, il quadro di sensibilità è differente rispetto a quello osservato in *B. hyodysenteriae*. Anche questo dato concorda con quanto osservato altrove: ad esempio in Svezia, dove non è stata mai registrata resistenza a tiamulina per *B. hyodysenteriae*, questa è stata rilevata per *B. pilosicoli* (Karlsson, 2004b; Pringle, 2006b).

Per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, con il campionamento attivo non è stato possibile individuare isolati resistenti a tiamulina e valnemulina, mentre la presenza di ceppi multi-resistenti è stata confermata dall'analisi dei risultati derivanti dal campionamento passivo. E' probabile che questa differenza sia legata al fatto che i ceppi del campionamento passivo derivano dall'attività diagnostica, con la quale si tende a individuare i casi ricorrenti o particolarmente problematici, ipotesi già peraltro indicata da altri autori (Bonilauri, 2004). Infatti, proprio la facilità della diagnosi predittiva che contraddistingue la dissenteria suina, di cui si parlato sopra, induce a eseguire i trattamenti in cieco, senza una conferma da parte del laboratorio diagnostico.

## CONCLUSIONI

La sensibilità alle pleuromutiline di *B. hyodysenteriae* negli allevamenti italiani appare buona. La diffusione di ceppi resistenti deve essere contenuta attraverso l'implementazione della biosicurezza, per evitare l'introduzione di ceppi resistenti in allevamento, e dall'uso di protocolli terapeutici appropriati.

Il monitoraggio periodico degli stipiti presenti in azienda, con il rilievo dei valori di minima concentrazione inibente, rappresenta uno strumento chiave per prevenire ed arrestare la diffusione di ceppi multi-resistenti. Infatti, poiché la resistenza a tiamulina in *B. hyodysenteriae* si sviluppa gradualmente, l'analisi del valore quantitativo della MIC, seguito nel tempo, può essere di aiuto nel rilievo precoce delle situazioni potenzialmente problematiche.

## BIBLIOGRAFIA

- Bonilauri P., Merialdi G., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. (2004) "Incremento del riscontro di ceppi multiresistenti di *B. hyodysenteriae* in allevamenti suini del nord Italia". Atti della Società Italiana di patologia e allevamento del suino, XX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme. 181-186.
- Bonilauri, P., Merialdi, G., Perini, S., Vezzali, Dottori, M. (2002) "Primo isolamento di *Brachyspira pilosicoli* dal suino in Italia". Obiettivi e documenti Veterinari, 1: 15-19.
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 2004. "Method for Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria" sixth 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.; 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., Aspan A., Landen A., Franklin A. (2004a) "Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin" Journal of Medical Microbiology. 53, 281-285.
- Karlsson M., Fellstrom C., Johansson K.E., Franklin A. (2004b) "Antimicrobial resistance in *Brachyspira pilosicoli* with special reference to point mutation in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance". Microbial drug resistance. 10: 204-208.
- Leser T. D., Møller K, Jensen TK, Jorsal SE.. (1997) "Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Molecular and Cellular probes (1997) 11, 363-372.
- Magistrali C.F. (2005) "Enteriti del magronaggio e ingrasso: altre patologie causate dal genere *Brachyspira* e loro impatto". Atti Società Italiana di Patologia e Allevamento del Suino, XXXI meeting annuale, Mantova: 147-156.
- Merialdi G., Bonilauri P., Granelli F., Perini S., Dottori M. (2002). Eziologia batterica e parassitaria di 82 casi di enterite nelle fasi di magronaggio e ingrasso con particolare riferimento alle infezioni da *Brachyspira* spp. Atti Società Italiana di patologia ed allevamento del suino.
- Merialdi G., Bonilauri p., Granelli F., Luppi A., Dottori M. (2003) "Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy" Vet Rec 153: 529-530.
- Molnar, L. (1996) Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemioterapeutic drugs. Vet. Rec. 138: 158-160.
- Pringle M., Asrestrup F.M., Bergsjø B., Fossi M., Jouy E., Landen A., Mevius D., Perry K., Teale C., Thompson J., Skrzypczak T., Veldman K., Franklin A. (2006a) "Quality control ranges for antimicrobial susceptibility testing by broth dilution of the *Brachyspira hyodysenteriae* type strain (ATCC 27164)". Microbial Drug Resistance 12, 219-221.
- Pringle M., Landen A., Franklin A. (2006b) "Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates" Research in Veterinary Science. 80: 1-4.
- Rasback T., Fellstrom C., Bergsjø 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.