

**LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI
MULTI-RESISTENTI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE*
RIVELA LA PRESENZA DI UN NUOVO GENE RESPONSABILE
DI RESISTENZA VERSO I LINCOSAMIDI**

***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MULTI-DRUG
RESISTANT STRAINS OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE
REVEALS THE PRESENCE OF A NEW LINCOSAMIDES-
RELATED RESISTANCE GENE***

DE LUCA S.¹, CUCCO L.¹, MASSACCI F.R.¹, MAGISTRALI C.F.¹, PERRETTEN V.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

² Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland

Parole chiave: antibiotico-resistenza, trasposone, mutazioni puntiformi

Key words: drug-resistance, transposon, single point mutations

Riassunto: L'utilizzo appropriato di antibiotici per la terapia della Dissenteria suina, malattia sostenuta dal batterio *Brachyspira hyodysenteriae*, è essenziale al fine di ridurre l'impatto della malattia negli allevamenti suini. Recentemente, sono stati registrati in tutta Europa fenomeni di resistenza da parte di *B. hyodysenteriae* nei confronti dei principali antimicrobici utilizzati per lo scopo, associati a mutazioni puntiformi a carico della proteina ribosomiale L3 o del 23S rRNA. Scopo di questo studio, è stato quello di caratterizzare dal punto di vista molecolare, ceppi di *B. hyodysenteriae* multi-resistenti isolati in Italia; in particolare, grazie ad un approccio con tecniche di sequenziamento di nuova generazione, è stato individuato per la prima volta in un ceppo di *B. hyodysenteriae* un gene (*lnu* tipo C) legato alla resistenza nei confronti dei lincosamidi e precedentemente descritto in *Streptococcus agalactiae* e in *Haemophilus parasuis*. Tale gene era localizzato su un elemento mobile (trasposone) ed è stato fortemente associato ad un Sequence Type (ST83), già precedentemente descritto come di recente distribuzione in Italia. Inoltre, i ceppi indicati presentavano una mutazione a carico della sequenza del 23S rRNA, descritta da altri autori come possibile fattore determinante resistenza crociata e aspecifica nei confronti di lincosamidi, pleuromutiline e macrolidi, indicando una possibile azione sinergica di più fattori che determinano multi-resistenza. I risultati indicano una possibile recente acquisizione di un determinante genetico da parte di ceppi multi-resistenti di *B. hyodysenteriae*, suggerendo come le tecniche di sequenziamento di nuova generazione essenziali per la determinazione di nuovi fattori genetici.

Abstract: The proper use of antibiotics for the therapy of Swine Dysentery, a disease caused by the bacterium *Brachyspira hyodysenteriae*, is crucial to reduce the impact of this disease in the pig industry. Recently, antibiotic-resistance phenomena of *B. hyodysenteriae* have been registered throughout Europe towards the antimicrobials mostly used for this purpose, associated to single point mutations on ribosomal protein L3 or 23S rRNA. The aim of this study was to characterize at molecular level multi-drug resistant strains *B. hyodysenteriae* isolated in Italy; in particular, new generation sequence techniques allowed to identify for the first time a novel gene (*lnu* type C) in a strain of *B. hyodysenteriae*, related to resistance to lincosamides and previously described in *Streptococcus agalactiae* and in *Haemophilus parasuis*. The gene was located on a mobile element (transposon) and was strongly associated to a Sequence Type (ST83), already described as recently spread in Italy. Furthermore, these strains presented a single-point mutation on 23S rRNA, reported by other authors as

a possible cause of cross-resistance against lincosamides, pleuromutilins and macrolides, indicating a possible synergic effect of multiple factors that can determine multi-resistance. Results demonstrates a possible recent acquisition of a genetic determinant by multi-resistant strains of *B.hydysenteriae*, showing that the new generation sequence techniques are crucial for the determination of novel genetic determinants.

INTRODUZIONE

Brachyspira hydysenteriae è l'agente eziologico della Dissenteria Suina, una malattia enterica caratterizzata da colite muco-emorragica e diarrea da moderata a grave, con conseguente riduzione di peso, ridotto accrescimento e mortalità nei casi gravi (Alvarez-Ordóez et al., 2013; Burrough, 2016). Il trattamento mirato con antibiotici, insieme all'utilizzo di appropriate misure di biosicurezza, è cruciale per la riduzione dell'impatto di tale patologia negli allevamenti suini (Hillen et al. 2014; Hampson et al., 2015). Gli antibiotici maggiormente utilizzati per questo scopo sono macrolidi, lincosamidi e pleuromutiline (Hillen et al., 2014). Negli ultimi anni, è stato registrato in Europa una riduzione nella sensibilità agli antimicrobici sopra descritti (Rohde et al., 2004; Hidalgo et al., 2011; Rugna et al., 2015). L'insorgenza di antibiotico-resistenza è stata legata alla presenza di mutazioni puntiformi (single nucleotide polymorphisms o SNPs) a carico del 23S rRNA o della proteina ribosomiale L3, le quali possono determinare alterazioni conformazionali che modificano il legame degli antibiotici con le subunità ribosomiali, dove normalmente agiscono inibendo la sintesi proteica (Pringle et al., 2004; Hidalgo et al., 2011;). Ad esclusione di quelle sopra descritte, non sono state riportate altri determinati genetici di antibiotico-resistenza di *Brachyspira hydysenteriae*.

Scopo del seguente lavoro è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare ceppi multi-resistenti di *B.hydysenteriae* isolati in Italia. In particolare, tramite tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), sono stati indagati i determinanti genetici di antibiotico-resistenza in un ceppo multiresistente di *B.hydysenteriae*; successivamente, la presenza di tali determinanti genetici è stata investigata in una collezione di ceppi di *B.hydysenteriae* sottoposti a test di sensibilità nei confronti di sei antibiotici comunemente utilizzati in allevamento per la terapia della Dissenteria Suina.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e test di sensibilità

Undici (n=11) isolati di *B.hydysenteriae*, provenienti da una collezione di ceppi dell'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, sono stati sottoposti ad analisi. Tutti i ceppi sono stati precedentemente identificati con certezza come *B.hydysenteriae* tramite restriction fragment length polymorphism del gene *nox* (Rohde et al., 2002). Inoltre, è stata valutata la sensibilità nei confronti di sei antibiotici (tilosina, tiamulina, valnemulina, lincomicina, tilvalosina e doxiciclina), secondo quanto previsto dal pannello VetMIC Brachy (SVA, Sweden). Nella tabella 1 sono descritte le informazioni relative ai ceppi utilizzati in questo studio.

Tra quelli disponibili, un ceppo (BH_718) è stato scelto per essere sottoposto ad analisi tramite Next Generation Sequencing (NGS). Tale ceppo proveniva da un allevamento del centro Italia endemicamente infetto da Dissenteria suina e presentava un profilo di multiresistenza, in particolare presentava un livello di MIC molto elevato nei confronti di tiamulina, tilosina e lincomicina.

Whole Genome Sequencing (WGS)

Il ceppo BH_718 è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione (NGS) presso il Genome Technology Facility dell'Università di Losanna (Svizzera). Il DNA è stato sequenziato tramite tecnologia Pacific Bioscience R.S. (70'000 reads/3000 bp average read length) e Illumina HiSeq (9'000'000 reads/300 average read length). La qualità dei risultati

ottenuti è stata valutata tramite piattaforma FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e assemblati tramite piattaforma Vital-IT (<http://www.vital-it.ch>), usando il modulo di assemblaggio 'ALLORA'. Sono stati ottenute due unità genomiche rappresentate dal genoma completo di *B. hyodysenteriae* ceppo 718 costituito da 3,086,550-bp di cui 3,018,636-bp del cromosoma batterico, con un contenuto G+C del 27.10%, e di un plasmide di 67,914-bp, con un contenuto G+C pari al 22.40%. Il genoma è stato annotato usando il software Prokka e sono state identificate un totale di 2,726 geni codificanti-proteine e 38 geni-RNA. La sequenza genomica è stata infine sottomessa all'analisi tramite software ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) al fine di identificare la presenza di eventuali geni coinvolti nel fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

Estrazione del DNA, condizioni di PCR e sequenziamento.

Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico tramite il kit DNeasy blood & tissue (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni della casa produttrice. Il DNA è stato quindi conservato a -20 °C in attesa di essere sottoposto a successive analisi. Tutti i primers utilizzati per le prove di PCR, le temperature di annealing e i tempi sono descritti nella tabella 2.

Una iniziale PCR è stata effettuata per valutare la presenza del gene *lnu(C)* utilizzando i primers int_1nuc forward e reverse (tabella 2); successivamente, i ceppi positivi sono stati sottoposti ad una seconda PCR al fine di amplificare l'intero elemento mobile Mtn*LNU* utilizzando i primers TN-*lnu* forward e reverse (tabella 2). I prodotti di PCR sono stati sequenziati come descritto successivamente. I primers per la PCR e il sequenziamento del gene *lnu(C)* e dell'elemento mobile Mtn*LNU* sono stati designati con il software Genious 10.0.5 (Kearse et al., 2012) with a focus on molecular sequences and related data types. It integrates numerous industry-standard discovery analysis tools, with interactive visualizations to generate publication-ready images. One key contribution to researchers in the life sciences is the Geneious public application programming interface (API).

Parte della subunità ribosomiale 50S, nello specifico il dominio V del 23S rRNA e il gene codificante per la proteina ribosomiale L3, sono stati amplificati e sequenziati come descritto da altri autori. (Hillen et al., 2014; Karlsson et al., 1999; Pringle et al., 2004). Per tutte le indagini in PCR, 2 µl di DNA sono stati aggiunti a 28 µl di una mix per PCR costituita in modo da avere una concentrazione finale di 1.5 mM MgCl₂, PCR buffer B, 0.2 mM desossinucleotidi trifosfati, 2.5 U DNA Polimerasi (FIREPol[®] DNA Polymerase, Solis BioDyne), 0.5 µM primer Forward e 0.5 µM primer Reverse.

Il DNA è stato amplificato alle seguenti condizioni: 95 °C per 15 minuti di attivazione della DNA polimerasi, 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, annealing come descritto in tabella 2 e estensione a 72°C per due minuti, seguiti da una estensione finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti di PCR sono stati direttamente sequenziati usando una reazione 10 µl totale composta da 1 µl di (5X) BigDye (Applied Biosystems, California, US), 2 µl di (10X) Buffer sequencing (Applied Biosystems, California, US), 3 µl di prodotti di PCR e Ultrapure water. Come sequenziatore è stato utilizzato il 3130 xl Genetic Analyzer con un Sistema a 16 capillari (Applied Biosystems, California, US).

Le sequenze ottenute sono state analizzate e corrette con il software Genious 10.0.5; in particolare, le sequenze parziali del 23S rRNA e del gene L3 sono state allineate e numerate in base alla numerazione dell' *Escherichia coli* (CP001357) e *B. hyodysenteriae* (C0QVZ) rispettivamente, mentre la regione Mtn*LNU* è stata allineata alla sequenza di *Streptococcus agalactiae* UCN36 (AY928180).

Multi Locus Sequence Typing

I ceppi sono stati tipizzati tramite metodica MLST al fine di valutare la clonalità dei ceppi seguendo il protocollo descritto da Rasback e collaboratori (Rasback et al.

2007)”. (Rasback et al. 2007 Le sequenze dei setti geni *housekeeping* sono stati analizzati e, se necessario, manualmente corretti grazie al software Sequencer 5.4.6 (Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA). A ciascun isolato è stato assegnato un ST in base al suo profilo allelico confrontando i profili con quelli disponibili sul database dei profili MLST di *B. hyodysenteriae* (<http://pubmlst.org>)

Tabella 1: Lista degli isolati analizzati in questo studio con Sequence Type, valori di MIC per tilosina, lincomicina, tiamulina, valnemulina, doxiciclina e tilvalosina, SNPs a carico del 23S rRNA e risultati della PCR per la detenzione del gene *lnu(C)*.

Table 1: List of isolates with Sequence Type, MICs for tylosin, lincomycin, tiamulin, valnemulin, doxycycline, tylvalosin, SNPs found on 23S rRNA and results of PCR for the detection of the *lnu(C)* gene.

Sample #	ST	TIL	LIN	TIA	VAL	DOXI	TILV	A2058	C2146	<i>lnu(C)</i>
B495	79	>128	8	0,5	0,5	0,5	1	T	C	Negativo
B516	83	>128	64	0,5	0,25	1	4	T	T	Positivo
B534	83	>128	64	8	4	0,5	8	T	T	Positivo
B538	83	>128	64	0,25	0,125	0,5	2	T	T	Positivo
B541	83	>128	64	>8	1	1	4	T	T	Positivo
B635	83	>128	64	8	1	1	2	T	T	Positivo
B674	83	>128	64	4	4	0,25	1	T	T	Positivo
B697	83	>128	>64	>8	2	1	4	T	T	Positivo
B699	83	>128	64	8	2	1	4	T	T	Positivo
B718	83	>128	64	8	4	8	8	T	T	Positivo

Tabella 2: Lista di primers utilizzati in questo studio

Table 2: List of primers used in this study

Primers	Target (dimensioni in bp)	Sequenza (5'-3')	Temp. ann.	Riferimento bibliografico
23SF 23SR	23S rRNA (910)	F: GAGAGGTTAGCGTAAGCGAAGC R: GCTTCCCACTTAGATGCTTTCAG	52 °C	Hillen et al. 2014
L3F L3R	Ribosomal protein L3 (750)	F: TATAGAGGATTCGCCGATGGTAG R: TCTCTAAATTGCCTACGCTATCTC	52 °C	Hillen et al. 2014
<i>lnu(C)_intR</i> <i>lnu(C)_intR</i>	<i>lnu(C)</i> gene (495)	F: TTTCTTGATGGTGGCTGGGG R: TCAAACCTCGTATCCCAGATGG	54 °C	This study
<i>lnu(C)_TN-F</i> <i>lnu(C)_TN-R</i>	Mobile element (1724)	F:AATTTTGCCATATATTCCGTAATGCT R:GCTTGCAAGCGGTGATAATAA	56 °C	This study

RISULTATI

L'analisi del genoma tramite software ResFinder ha permesso di identificare per la prima volta in *B. hyodysenteriae* la presenza del gene *lnu* (lincosamides nucleoditylation) tipo C. Il gene era localizzato su un elemento mobile insieme ad un gene codificante per l'enzima transposasi facente parte della classe delle transposasi IS1. Tale elemento mobile, chiamato MtnLNU, era delimitato da due regioni di 25 basi invertite, tipiche dei transposoni, i due geni erano localizzati in posizione 996181-997900 del ceppo BH_718, per una lunghezza totale di 1.724 basi. L'elemento mobile è stato trovato essere molto simile (99%) a quelli già

descritti da altri autori in *Streptococcus agalactiae* UCN36 e *Haemophilus parasuis* HN7061 (Figura 1). La PCR effettuata al fine di identificare il gene *lnu(C)*, ha permesso di evidenziare la presenza di questo in 9 ceppi su 10 e tutti loro presentavano lo stesso elemento mobile integrato nel genoma. L'analisi a carico del 23S rRNA ha permesso di evidenziare la presenza di due mutazioni puntiformi in posizione 2058 e 2146 (*E.coli* numbering) negli stessi ceppi presentanti il gene *lnu(C)*, il ceppo restante presentava solo la mutazione in posizione 2058. Nessuna mutazione a carico di L3. La MLST ha permesso di evidenziare la clonalità dei ceppi sottoposti ad analisi, i quali, ad esclusione di uno, appartenevano al Sequence Type 83.

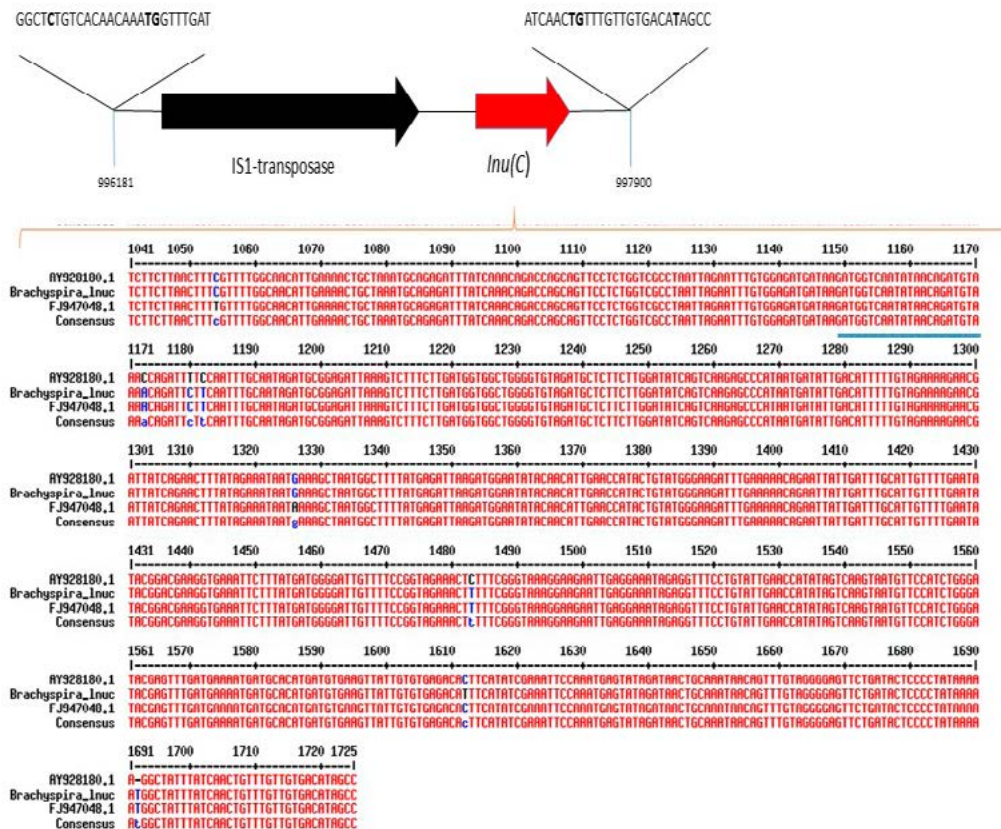


Figura 1: Mappa schematica dell'elemento mobile rinvenuto nel ceppo di *B.hydysenteriae* (BH_718) sottoposto a *Whole Genome Sequencing*. L'elemento contiene un gene codificante per l'enzima *transposase* (tipo IS1) e il gene *lnu(C)*. L'allineamento tra le sequenze del gene *lnu(C)* di BH_718, *S.agalactiae* (AY8180.1) e *H.parasuis* (FJ947048.1), mette in evidenza l'alta omologia tra le sequenze.

Figure 1: Schematic map of mobile element found on *B.hydysenteriae* (BH_718) submitted to *Whole Genome Sequencing*. The element contain a gene encoding for a transposase (type IS1) and the *lnu(C)* gene. The alignment of the three sequences of the *lnu(C)* gene of BH_718, *S.agalactiae* (AY8180.1) e *H.parasuis* (FJ947048.1), enhance the high similarity between them.

DISCUSSIONE

In questo studio, è stata dimostrata per la prima volta la presenza di un gene responsabile di resistenza nei confronti dei lincosamidi in *Brachyspira hyodysenteriae*. Tale gene, definito *lnu(C)* è stato già descritto in in *Streptococcus agalactiae* UCN36 (Achard et al. 2005) e in *Haemophilus parasuis* (Chen et al. 2010). Il gene è inserito all'interno di una regione transposonica, definita *MtnLNU*, che, essendo un elemento genetico mobile, potrebbe essere trasferito tra batteri di famiglie e generi diversi. Il gene *lnu(C)* appartiene ad una classe di geni responsabili della sintesi di enzimi che vanno a inattivare in maniera specifica i lincosamidi tramite reazioni di nucleotidilazione e fosforilazione del gruppo ossidrilico in posizione 3 (Achard et al. 2005). Sono stati descritte diverse forme di tale gene, ad esempio *lnu(A)*, *lnu(B)* e *lnu(F)* in *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli*, rispettivamente (Brisson-Noël and Courvalin 1986; Bozdogan et al. 1999; Heir et al. 2004). In *B.hyodysenteriae*, una resistenza crociata e aspecifica nei confronti dei macrolidi e della lincomicina è stata descritta come esito di mutazioni puntiformi a carico del 23S rRNA; in particolare, la sostituzione di un nucleotide (A→T) in posizione A2058 (*E.coli* numbering) è stata indicata essere responsabile di modificare la struttura del centro dell'enzima peptidil-trasferasi (PTC), a livello del quale agiscono gli antibiotici sopra citati. Tale mutazione è stata riscontrata da diversi autori, tuttavia, in uno studio di Hidalgo e collaboratori (2011), alcuni ceppi di *B.hyodysenteriae* presentavano la mutazione A2058T ma erano suscettibili nei confronti della lincomicina. Nel nostro studio, tutti i ceppi che albergavano il gene *lnu(C)* presentavano la mutazione A2058 ed erano resistenti sia nei confronti della tilosina che della lincomicina, tuttavia, l'unico ceppo non presentante il gene, presentava una MIC molto più bassa rispetto ai ceppi *lnu(C)*-positivi, indicando un effetto da parte del gene sulla sensibilità del ceppo batterico. Interessante notare come tutti i ceppi *lnu(C)*-positivi appartenevano al ST83; questo ST è stato descritto per la prima volta da Rugna e collaboratori nel 2015 (Rugna et al. 2015) e descritto come ceppo multiresistente e di recente distribuzione in Italia. Questo evidenzia la possibilità di persistenza negli allevamenti suini italiani di ceppi con una scarsa sensibilità nei confronti di diverse classi di antibiotici dovuta all'acquisizione di determinanti genetici anche trasferiti da altre specie batteriche.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata dimostrata per la prima volta la presenza di un nuovo gene collegato alla resistenza nei confronti della lincomicina e fortemente connesso ad uno specifico ceppo clonale. Ulteriori studi sono richiesti per verificare l'effettiva distribuzione del gene sopra descritto nella popolazione batterica e l'effetto che tale gene potrebbe avere su altri antibiotici facenti parte della classe dei lincosamidi. In ultima analisi le tecniche di sequenziamento di nuova generazione si sono rivelate essere indispensabili per l'acquisizione di nuove conoscenze nell'ambito dell'antibiotico resistenza.

BIBLIOGRAFIA

- Achard, A., C. Villers, V. Pichereau, and R. Leclercq. 2005. "New *lnu(C)* Gene Confering Resistance to Lincomycin by Nucleotidylation in *Streptococcus Agalactiae* UCN36." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2716–19.
- Alvarez-Ordóez, Avelino, Francisco Martínez-Lobo, Héctor Arguello, Ana Carvajal, and Pedro Rubio. 2013. "Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (5): 1927–47.
- Bozdogan, Bülent, Latifa Berrezouga, Ming-Shang Kuo, David A. Yurek, Kathleen A. Farley, Brian J. Stockman, and Roland Leclercq. 1999. "A New Resistance Gene, *linB*, Confering Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus Faecium* HM1025." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (4): 925–929.

- Brisson-Noël, A., and P. Courvalin. 1986. "Nucleotide Sequence of Gene *linA* Encoding Resistance to Lincosamides in *Staphylococcus Haemolyticus*." *Gene* 43 (3): 247–53.
- Burrough, E. R. 2016. "Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease." *Veterinary Pathology*, June..
- Chen, L.-P., X.-W. Cai, X.-R. Wang, X.-L. Zhou, D.-F. Wu, X.-J. Xu, and H.-C. Chen. 2010. "Characterization of Plasmid-Mediated Lincosamide Resistance in a Field Isolate of *Haemophilus Parasuis*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (10): 2256–58.
- Hampson, David J., Tom La, and Nyree D. Phillips. 2015. "Emergence of *Brachyspira* Species and Strains: Reinforcing the Need for Surveillance." *Porcine Health Management* 1 (1).
- Heir, Even, Bjørn-Arne Lindstedt, Truls M. Leegaard, Elisabet Gjernes, and Georg Kapperud. 2004. "Prevalence and Characterization of Integrons in Blood Culture Enterobacteriaceae and Gastrointestinal *Escherichia Coli* in Norway and Reporting of a Novel Class 1 Integron-Located Lincosamide Resistance Gene." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 3 (1): 1.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, B. Vester, M. Pringle, G. Naharro, and P. Rubio. 2011. "Trends towards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistance among Clinical Isolates of *Brachyspira Hyodysenteriae* in Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (7): 3330–37..
- Hillen, Sonja, Hermann Willems, Werner Herbst, Judith Rohde, and Gerald Reiner. 2014. "Mutations in the 50S Ribosomal Subunit of *Brachyspira Hyodysenteriae* Associated with Altered Minimum Inhibitory Concentrations of Pleuromutilins." *Veterinary Microbiology* 172 (1–2): 223–29..
- Karlsson, Märit, Claes Fellström, Malin UK Heldtander, Karl-Erik Johansson, and Anders Franklin. 1999. "Genetic Basis of Macrolide and Lincosamide Resistance in *Brachyspira* (*Serpulina*) *Hyodysenteriae*." *FEMS Microbiology Letters* 172 (2): 255–260.
- Kearse, Matthew, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, et al. 2012. "Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data." *Bioinformatics* 28 (12): 1647–49.
- Pringle, Märit, Jacob Poehlsgaard, Birte Vester, and Katherine S. Long. 2004. "Mutations in Ribosomal Protein L3 and 23S Ribosomal RNA at the Peptidyl Transferase Centre Are Associated with Reduced Susceptibility to Tiamulin in *Brachyspira* Spp. Isolates: Tiamulin Resistance in *Brachyspira* Spp. Isolates." *Molecular Microbiology* 54 (5): 1295–1306.
- Rasback, T., K.-E. Johansson, D. S. Jansson, C. Fellstrom, M. Y. Alikhani, T. La, D. S. Dunn, and D. J. Hampson. 2007. "Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Intestinal Spirochaetes within the Genus *Brachyspira*." *Microbiology* 153 (12): 4074–87.
- Rohde, J. 2004. "Comparison of Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing and MIC Values for Pleuromutilin Drugs for *Brachyspira Hyodysenteriae* Isolated in Germany." *Veterinary Microbiology* 102 (1–2): 25–32.
- Rohde, J., A. Rothkamp, and G. F. Gerlach. 2002. "Differentiation of Porcine *Brachyspira* Species by a Novel *Nox* PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2598–2600.
- Rugna, G., P. Bonilauri, E. Carra, F. Bergamini, A. Luppi, Y. Gherpelli, C.F. Magistrali, et al. 2015. "Sequence Types and Pleuromutilin Susceptibility of *Brachyspira Hyodysenteriae* Isolates from Italian Pigs with Swine Dysentery: 2003–2012." *The Veterinary Journal* 203 (1): 115–19.