

# VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ IN VITRO DI CEPPI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* ISOLATI NEL PERIODO 2005-2018 IN ITALIA

## IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* STRAINS ISOLATED IN ITALY FROM 2005 TO 2018

BONILAURI P., PANGALLO G., LUPPI A., GHERPELLI Y., DE LORENZI G.,  
LEONELLI R., DOTTORI M., MERIALDI G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna*

**Parole chiave:** MIC, *Brachyospira hyodysenteriae*, antibiotico resistenza.

**Key words:** MIC, *Brachyospira hyodysenteriae*, antimicrobial resistance.

### RIASSUNTO

In questo studio sono riportati i risultati della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) di 353 ceppi di *Brachyospira hyodysenteriae* isolati in Italia nel periodo 2005-2018 nei confronti dei seguenti antibiotici: doxiciclina, lincomicina, tiamulina, tilosina, tilvalosina e valnemulina. Il 70% dei ceppi è risultato resistente o a ridotta sensibilità per tiamulina e valnemulina, mentre il 67% dei ceppi è risultato pienamente sensibile a tilvalosina. Le MIC50 e MIC90 degli altri antibiotici testati sono risultate molto elevate, indicando una elevata diffusione della resistenza nel batterio. Valutando l'andamento temporale della prevalenza dei ceppi a ridotta sensibilità nell'intervallo temporale studiato, si osserva come la prevalenza dei ceppi cosiddetti *wild type* (con MIC inferiori al *break point* epidemiologico) appaia in diminuzione, confermando una progressiva diffusione sul territorio di ceppi resistenti o a ridotta sensibilità.

### ABSTRACT

In this study the minimum inhibitory concentration (MIC) of 353 strains of *Brachyospira hyodysenteriae* isolated in Italy in the period 2005-2018 versus doxycycline, lincomycine, tiamulin, tylosin, tilvalosine and valnemulin are reported. 70% of the tested strains resulted resistant or not fully susceptible to tiamulin and valnemulin. 67% of the tested strains resulted fully susceptible to tilvalosin. MIC 50 and MIC 90 values for the other antibiotics are very high suggesting an extended presence of resistant strains. The evaluation of trends during the considered period shows a decreasing rate of fully of wild type strains (with MIC lower than the epidemiological cut off) over time, confirming the threat that resistant and not fully susceptible strains are continuously spreading over the considered area.

### INTRODUZIONE

*Brachyospira hyodysenteriae* è stata identificata per la prima volta nel 1920 ma è stata definitivamente individuata quale agente eziologico della dissenteria emorragica (SD) del suino soltanto nei primi anni '70 del secolo scorso (Taylor and Alexander, 1971; Glock and Harris, 1972; Harris et al., 1972b). La SD è una malattia enterica trasmissibile tipica delle fasi di magronaggio ed ingrasso che continua a causare gravi problemi economici nell'allevamento suino in tutto il mondo, dovuti alla mortalità dei soggetti colpiti, al lento accrescimento, alla scarsa conversione dell'alimento ed ai costi dei trattamenti. La malattia è ancora ben presente e spesso grave negli allevamenti di suini pesanti, in Italia. Clinica-

mente la dissenteria è caratterizzata da una diarrea muco-emorragica causata dalla colonizzazione dell'epitelio cieco-colico che conduce i soggetti colpiti a perdita di peso, disidratazione, cachessia e, nei casi più gravi, a morte con mortalità che può arrivare al 30% e morbilità anche al 90% nei casi più gravi (Wannemueller, 1993). Allo stato attuale delle conoscenze, data l'assenza di vaccini di comprovata efficacia, il controllo della malattia si attua essenzialmente tramite la combinazione di interventi gestionali e di trattamenti farmacologici. La presenza di ceppi resistenti o multi-resistenti a tutti i farmaci autorizzati per l'allevamento suino in Italia è stata riportata fin dal 2004 (Bonilauri et. al 2004) ed è comunque esperienza comune in Europa l'osservazione di ceppi di *B. hyodysenteriae* a ridotta sensibilità a differenti antibiotici (Rohde et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Pringle et al., 2012). Inoltre, le condizioni igienico sanitarie dell'allevamento, le dinamiche dei flussi degli animali, le pratiche di lavaggio e disinfezione degli ambienti rappresentano determinanti altrettanto imprescindibili nella valutazione dell'efficacia del trattamento farmacologico (Meriardi 2013).

Dal 1999 l'isolamento da campioni clinici di suini (feci, tamponi e visceri) di *B. hyodysenteriae* e delle altre spirochete intestinali (*B. innocens*, *B. murdochii*, *B. intermedia* e *B. pilosicoli*), è stato eseguito in modo ripetuto e continuo e i dati di sensibilità in vitro a differenti farmaci antimicrobici è stata testata tramite MIC. Fino al 2004 i dati di sensibilità in vitro sono stati ottenuti tramite metodica QUIKMIC in agar precedentemente descritta (Bonilauri et. al 2003). Dal 2005 si è passati alla determinazione della MIC in brodo in quanto questa metodologia permette una determinazione della sensibilità ai farmaci antimicrobici maggiormente precisa e ripetibile. I dati relativi alla sensibilità in vitro per le pleuromutiline (Tiamulina e Valnemulina) relativi a parte dei ceppi isolati nel periodo 2003–2012 sono stati precedentemente riportati in Rugna et. al. (2015). Scopo del presente lavoro è quello di riportare di dati sensibilità in vitro nei confronti di doxiciclina, tilosina, tilvalosina, tiamulina e valnemulina ottenuti sui ceppi isolati dal 2005 al 2018, aggiornando e completando quanto precedentemente pubblicato.

## **MATERIALI E METODI**

### **Isolamento e determinazione della MIC**

In questo studio sono stati inclusi 353 ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati a partire da campioni di carcasse, visceri e feci di suini di peso compreso fra 30 e 150 Kg con forme diarroiche di varia natura conferiti tra il 2005 e 2018 alla Sede Territoriale di Reggio Emilia dell'IZSLER. L'esame culturale per *B. hyodysenteriae* e l'identificazione in specie sono stati condotti secondo la metodologia standard. In breve, il materiale patologico è stato seminato su terreno B.A.M e incubato per 5 giorni a 37°C in anaerobiosi. La presenza di *Brachyspira spp.* è stata confermata tramite osservazione microscopica a contrasto di fase e ingrandimento a 400x e la tipizzazione di specie è stata ottenuta tramite valutazione della forza dell'emolisi mostrata dai ceppi e confermata tramite PCR (Leser et al. 1997, Fellstrom 1997, Atyeo et al 1999 e La et al. 2006). I ceppi di *B. hyodysenteriae* indirizzati alla determinazione della MIC sono stati sospesi in 2 ml di brodo BHI con aggiunta di 10% di siero fetale bovino in modo da ottenere una sospensione batterica contenente 10<sup>8</sup> ufc/ml. La sensibilità *in vitro* di tutti i ceppi di *B. hyodysenteriae* in esame è stata valutata nei confronti di doxiciclina, lincomicina, tiamulina, tilosina, tilvalosina e valnemulina, tramite il kit commerciale VetMIC Brachy (National Veterinary Institute, SVA, Sweden) ed applicando le procedure indicate dal CLSI M31-A3 (Edition, Approved Standard-Third. "CLSI documents M31-A3." Clinical and Laboratory Standards Institute 940.). Il ceppo WA6 (*B. hyodysenteriae*, ATCC 49527) è stato usato come ceppo di controllo. Le piastre, una volta allestite, sono state incubate in anaerobiosi a 37° per 4 giorni.

## Analisi statistica e Interpretazione della MIC

I dati di MIC per ogni antibiotico testato sono stati rappresentati come MIC50 e MIC90, rispettivamente il valore di MIC in grado di inibire il 50% ed il 90% dei ceppi testati. Nella valutazione dell'andamento temporale dei valori di MIC osservati i ceppi sono stati arbitrariamente suddivisi in 2 raggruppamenti, 2005-2012, e 2013-2018. Il confronto tra la distribuzione in classi di frequenza nei 2 periodi è stato effettuato tramite test Chi<sup>2</sup> di Pearson utilizzando il software STATA 7.0, il livello di significatività è stato posto a  $p < 0.01$ .

L'interpretazione dei valori di MIC osservati in termini di efficacia in vitro del farmaco è stata la seguente: Tilvalosina: sensibile  $\leq 16$   $\mu\text{g/mL}$  - intermedio 32  $\mu\text{g/mL}$  - resistente  $> 32$   $\mu\text{g/mL}$  --- Tiamulina: sensibile  $< 1$   $\mu\text{g/mL}$  - intermedio 1-4  $\mu\text{g/mL}$  - resistente  $> 4$   $\mu\text{g/mL}$  --- Valnemulina: : sensibile  $< 1$   $\mu\text{g/mL}$  - intermedio 1-4  $\mu\text{g/mL}$  - resistente  $> 4$   $\mu\text{g/mL}$ , secondo quanto pubblicato da Rønne H. e Szancer (1990) e da Tasker et al. 2004, per gli altri antibiotici testati non è possibile esprimere una interazione in termini di efficacia della MIC osservata per mancanza di brack point validati

## RISULTATI

I dati vengono rappresentati per l'intero periodo monitorato e suddivisi arbitrariamente in 2 periodi di tempo: 2005-2012 e 2013-2018. Per ogni antibiotico testato il valore di MIC50 e MIC90 osservato in tutto il periodo di tempo considerato è riassunto testato in tabella 1. La distribuzione dei valori di MIC osservati relativamente all'intero periodo di tempo e separatamente nei periodi considerati, sono rappresentati in figura 1.

Tabella 1: MIC50 e MIC90 e range di 5 antibiotico nei confronti di ceppi italiani di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati tra il 2005 e il 2018.

Table 1: MIC50, MIC90, and ranges for five antimicrobial agents against Italian field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* recovered between 2005 and 2018

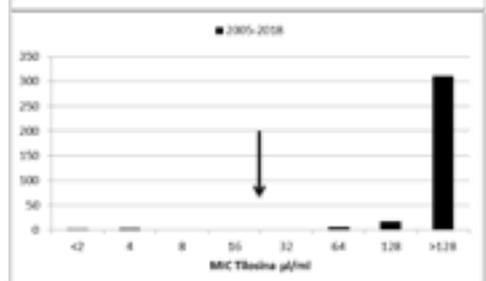
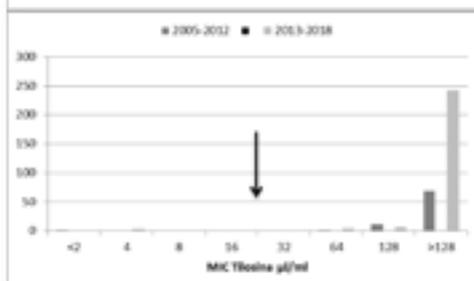
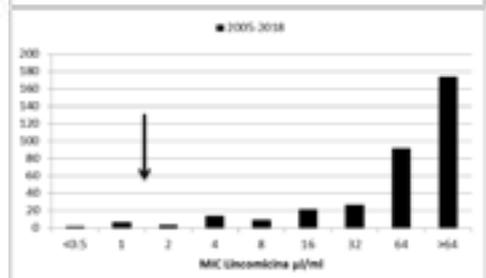
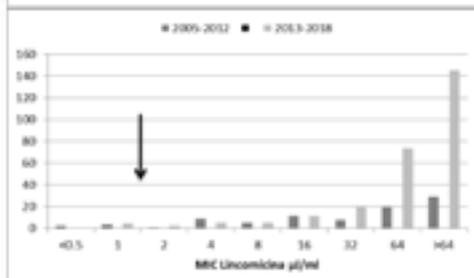
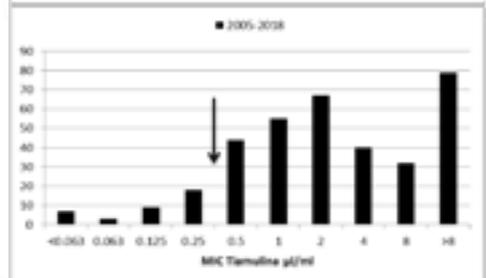
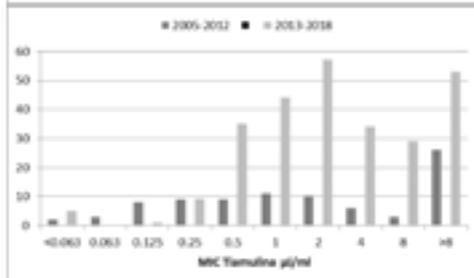
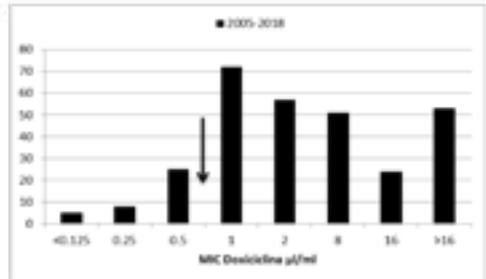
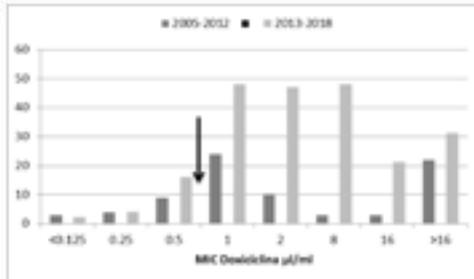
ANTIBIOTICO	n	MIC50 $\mu\text{l/ml}$	MIC90 $\mu\text{l/ml}$	range
doxiciclina	343	4	$> 16$	$< 0.125 - > 16$
lincomicina	328	64	$> 64$	$< 0.4 - > 64$
tiamulina	353	2	$> 8$	$< 0.063 - > 8$
tilosina	343	$> 128$	$> 128$	$< 2 - > 128$
tilvalosina	331	16	$> 32$	0.25-64
valnemulina	353	2	$> 4$	$< 0.031 - > 4$

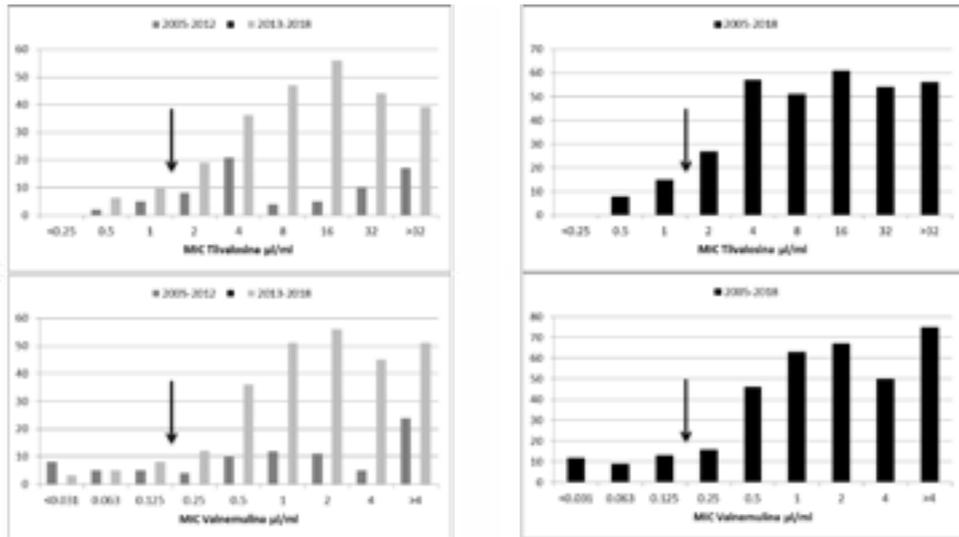
Relativamente all'interpretazione delle MIC sulla base dei break point validati disponibili, si conferma l'elevata presenza di ceppi a ridotta sensibilità per le pleuromutiline (70% del totale dei ceppi esaminati). Tilvalosina è risultata invece sensibile pienamente efficace nel 67% dei ceppi testati.(tab.2),

Tabella 2: distribuzione in classi di sensibilità dei ceppi italiani di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati tra il 2005 e il 2018 per gli antibiotici tiamulina, tilvalosina e valnemulina.

Table 2: sensitivity distribution of tiamulin, tylvalosin e valnemulin against Italian field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* recovered between 2005 and 2018.

ANTIBIOTICO	SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE
TIAMULINA	81(23%) ( $\leq 1 \mu\text{l/ml}$ )	161(46%) ( $1 \mu\text{l/ml}$ - $4 \mu\text{l/ml}$ )	111(31%) ( $>4 \mu\text{l/ml}$ )
TILVALOSINA	221(67%) ( $<16 \mu\text{l/ml}$ )	54 (16%) ( $32 \mu\text{l/ml}$ )	56(17%) ( $>32 \mu\text{l/ml}$ )
VALNEMULINA	99(28%) ( $\leq 1 \mu\text{l/ml}$ )	179 (51%) ( $1 \mu\text{l/ml}$ - $4 \mu\text{l/ml}$ )	75(21%) ( $>4 \mu\text{l/ml}$ )





**Figura 1:** Suscettibilità antimicrobica: distribuzione degli isolati di *B. hyodysenteriae* di campo italiani del valore di MIC per i sei agenti antimicrobici testati. Le frecce indicano i valori di cut-off epidemiologici proposti in Pringle et al. (2012).

**Figure 1:** Antimicrobial susceptibility : distribution of MIC of six antimicrobial agents for Italian field isolates of *B. hyodysenteriae*. Arrows indicate proposed wild type cutoff values proposed by in Pringle et al. (2012).

Nella figura 1 troviamo la distribuzione dei ceppi di *B. hyodysenteriae* in classi di frequenza per i 5 antibiotici testati sia considerando tutto il periodo di tempo compreso tra il 2005 ed il 2018 sia suddividendo temporalmente i ceppi nei due intervalli di tempo considerati. Con la freccia è indicato il cut-off epidemiologico proposto da Pringle et al. (2012) sulla base dei risultati ottenuti in ceppi svedesi. La doxyciclina nell'intero periodo mostra un tipico andamento bimodale, con una buona presenza di ceppi a MIC=1 accompagnati da una quasi altrettanto numerosa presenza di ceppi a MIC>16. Discorso simile anche per la Tiamulina, dove è la classe di ceppi a MIC=2 risulta ben rappresentata, ma la moda della distribuzione è rappresentata dalla classe di ceppi a MIC>8. La distribuzione dei ceppi per lincomicina invece presenta una forte asimmetria a destra, con la larga maggioranza dei ceppi presentanti MIC≥64. Identico andamento presenta la distribuzione dei ceppi nelle MIC per Tilosina, dove si conferma la assoluta resistenza della totalità dei ceppi testati, come oramai assodato da anni. Situazione di difficile interpretazione per la Tilvalosina che presenta una curva di tipo rettangolare con eguale rappresentazione dei ceppi tra MIC4 e MIC>32, che comunque consente di osservare la presenza di ceppi classificati come sensibili in vitro (67% tab.2). Infine anche per Valnemulina si osserva una certa equi rappresentanza di ceppi con MIC comprese tra 1 e >4, che però in questo caso rappresenta una alta frequenza di ceppi a ridotta sensibilità per questo antibiotico (72% tab.2).

Venendo all'analisi temporale , per doxyciclina, tiamulina, tilvalosina e valnemulina la distribuzione in classi di MIC risulta differente nei due periodi doxyciclina (Pearson  $\chi^2(7) = 30.1$   $p < 0.001$  ), tiamulina (Pearson  $\chi^2(9) = 48.9$   $p < 0.001$  ) tilvalosina (Pearson  $\chi^2(7) = 24.9$   $p = 0.001$  ) e valnemulina (Pearson  $\chi^2(8) = 30.8$   $p < 0.001$  ). In particolare, le classi al di sotto del cut-off epidemiologico, identificanti probabili ceppi *wild type* , risultano

maggiormente rappresentate nel primo periodo di tempo considerato (2005-2012), ad esempio per Doxiciclina i ceppi al di sotto del cut-off di 0.5 µl/ml erano il 20.5% tra il 2005 ed il 2012 e si riducono al 10.1% tra il 2013-2018. Per Tiamulina i ceppi presunti *wild type* scendono dal 25.3% del primo periodo di tempo al 5.6% dell'ultima rilevazione, una stessa riduzione di ceppi *wild type* si è osservata per Valnemulina dove rispetto al primo periodo di tempo (21.4%) si è passati ad un 6% soltanto tra il 2013 ed il 2018. Minore, ma comunque presente e significativa la riduzione per Tilvalosina, dove i ceppi *wild type* passano dal 12.7% al 7.3% confrontando i due periodi di tempo.

## DISCUSSIONE

Tutti i risultati sono stati ottenuti applicando il medesimo metodo attraverso l'utilizzo dello stesso kit commerciale. I risultati dei ceppi di controllo, sempre presenti ad ogni seduta, hanno dato i risultati attesi confermato la qualità dei risultati nel tempo.

Comparando i risultati ottenuti con quelli presenti in letteratura, la situazione italiana appare piuttosto preoccupante. Rispetto ai ceppi svedesi pubblicati da Pringle et al. 2012 riferibili all'intervallo temporale 1990 – 2010 su un paragonabile numero di ceppi (582), i dati italiani mostrano una distribuzione dei ceppi con MIC superiore al cut-off epidemiologico proposto dagli autori svedesi nettamente superiore. Come si vede in figura 1, adottando il medesimo livello di cut-off proposto per l'utilizzo in Svezia al fine di monitorare la presenza di ceppi a ridotta sensibilità ai farmaci (definiti come non selvaggi - *non-wild type*) l'Italia vedrebbe per tutti gli antibiotici considerati una larga maggioranza di ceppi definibili come "non selvaggi". Situazione ancora più favorevole è stata riportata per ceppi polacchi da Zmudzki et al. 2012, dove sono stati riportati dati su ceppi isolati tra il 2006 ad il 2010 (n=25) e dove le totalità dei ceppi testati mostra MIC <1 µg/mL per Tiamulina e <2 µg/mL per Valnemulina e Doxiciclina. In Svizzera è stata riportata una situazione decisamente favorevole infatti Kirchgässner et al. (2016) riporta per 30 ceppi isolati sul territorio elvetico tra il 2009 ed il 2015 una elevata sensibilità per Tiamulina e Valnemulina con la totalità dei ceppi inibiti già alla concentrazione di 0.125 µg/mL e un MIC range per doxiciclina ≤0.25 µg/mL (47%) - 2 µg/mL (10%), Lincomicina ≤0.5 µg/mL (30%) and 32 µg/mL (43%) – tilvalosina ≤0.25 µg/mL (10%) and 8 µg/mL (20%). Anche rispetto a dati rilevati in Spagna (Hidalgo 2009; 87 ceppi tra il 2008 ed il 2009) la nostra situazione appare peggiore (MIC<sub>50</sub> per tiamulina, valnemulina = 1 µg/mL e MIC<sub>90</sub> = a 8 µg/mL e 4 µg/mL rispettivamente – Tilvalosina MIC<sub>50</sub> = a 4 µg/mL per MIC<sub>90</sub> = 16). Soltanto in repubblica Ceca (Šperling et al. 2011 a Taiwan (Yeh et al. 2018) sono stati osservati ceppi di *B. hyodysenteriae* a ridotta sensibilità ai farmaci disponibili in proporzioni simili a quelle osservate sul territorio italiano. Anche relativamente all'analisi temporale appare evidente come tra i ceppi isolati tra il 2013 ed il 2018 vi siano significativamente meno ceppi *wild-type* per Doxiciclina, Tiamulina, Tilvalosina e Valnemulina, testimoniando che la situazione generale è evidentemente peggiorata e questi ceppi pienamente sensibili ai farmaci testati siano oramai una minoranza sul territorio nazionale.

Se si esclude la resistenza a Tilosina che viene a determinarsi per una semplice mutazione puntiforme nel gene del RNA ribosomiale 23S bersaglio del farmaco (Karlsson et al. 1999 e 2004) e che è stato dimostrato si manifesta frequentemente dopo pochi passaggi dei ceppi *in vitro* in presenza di concentrazione sub-letali del farmaco, lo sviluppo delle resistenze ai farmaci in *B. hyodysenteriae* è un fenomeno complesso. Ad esempio per la Tilvalosina, che è anch'essa un macrolide, è stata ipotizzata la cross-resistenza con la Tilosina (Karlsson et al. 2004), ma questa evidenza non è stata dimostrata successivamente in quanto Pringle et al. (2012) hanno descritto ceppi completamente resistenti a Tilosina mostrare MIC molto basse per Tilvalosina. Una situazione simile è osservabile anche tra i ceppi italiani qui presentati, dove la quasi totalità di questi ha mostrato MIC contro Tilosina >128 µg/mL, ma la questi

stessi ceppi hanno una distribuzione di MIC nei confronti di Tilvalosina equamente distribuita tra tutti i valori di concentrazione testati. Per questo farmaco utilizzando il *break point* della resistenza a  $>16 \mu\text{l/ml}$  che risulta anche quello suggerito come BP clinico da Burch (2005) quasi il 70% dei ceppi testati in tutto il periodo risulterebbe sensibile al farmaco. Va tuttavia osservato che anche per questo farmaco, si è osservata la riduzione dei ceppi *wild type* nell'ultimo periodo di tempo considerato. Inoltre tra il 2013 ed il 2018 si può osservare come le MIC si distribuiscono in modo unimodale con moda a 16, che indica come la situazione attuale potrebbe velocemente peggiorare nei prossimi anni. Per l'istaurazione della resistenza alla Doxiciclina è stata ipotizzata una mutazione puntiforme sul gene del 16S rRNA (Pringle et al. 2007 ; Verlinden et al. 2011), la presenza di questa mutazione porterebbe le MIC a valori  $>0.5 \mu\text{l/ml}$ . Tra i ceppi italiani quelli a MIC per Doxiciclina inferiore a  $<0.5 \mu\text{l/mL}$ , supposti *wild type* rappresentano soltanto il 13% nell'intero periodo e scendono al 10% negli ultimi 5 anni.

La resistenza a Tiamulina è un fenomeno oltremodo complesso e compare in più step che comportano mutazioni successive nei siti di riconoscimento del farmaco sul ribosoma (Hidalgo et al. 2011 e Pringle et al. 2004). Ogni mutazione determina un incremento nel livello di MIC osservato tra i ceppi, pur tuttavia esistono ceppi che non mostrano nessuna mutazione nei siti noti per la resistenza che presentano comunque MIC  $>8 \mu\text{l/mL}$  (Pringle et al. 2012). Per Valnemulina spesso i risultati sono concordi, anche se il valore di MIC risulta di una o due diluizioni più bassa.

Per i ceppi di *B. hyodysenteriae* italiani risulta oramai consolidato il fenomeno della multi resistenza a tutti i farmaci autorizzati. Considerando l'intervallo temporale 2015-2018, i ceppi con MIC  $> 1 \mu\text{l/mL}$  per Tiamulina (n=98 su 150) sono risultati sempre  $> 1 \mu\text{l/mL}$  per Valnemulina, sempre  $>0.5$  per Doxiciclina, sempre  $>128 \mu\text{l/mL}$  per Tilosina,  $>36 \mu\text{l/mL}$  per Lincomicina nel 95% dei casi e nel 44% dei casi  $>16 \mu\text{l/mL}$  per Tilvalosina, portando la presenza di ceppi multi resistenti al 65%. Questo fenomeno era già stato segnalato da noi nel 2004 dove questi ceppi multi-resistenti risultavano essere però soltanto il 15% del totale (Bonilauri et al. 2004).

Alla luce di questo, la scelta delle molecole da utilizzare nella terapia della dissenteria emorragica in Italia è molto limitata e dovrebbe sempre essere accompagnata da una preventiva determinazione della MIC *in vitro*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Atyeo R.F., Stanton T.B., Jensen N.S., Suriyaarachichi D.S, Hampson D.J. (1999) - Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbial.* 67. 47-60.
2. Bonilauri, P., Merialdi, G., Granelli, F., Luppi, A., & Dottori, M. (2003). In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* strains from 1999 to 2002 [swine]. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (Italy)*.
3. Bonilauri, P., Merialdi, G., Calzolari, M., Luppi, A., & Dottori, M. (2004). Increase of multi-resistant strains of *Brachyspira hyodysenteriae* in Italian swine herds. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (Italy)*.
4. Buller NB, Hampson DJ (1994). Antimicrobial susceptibility testing of *Serpulina hyodysenteriae*. *American Veterinary Journal* 71, 211-214;
5. Burch D.G.S. (2005) Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations. *The Pig Journal* 56, 8-24
6. Cizek A., Lobova D., Smola J. (2002). *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* strains isolated in the Czech republic from 1996 to 2001. *Proceeding of the 17<sup>th</sup>*

- Congress of the International Pig Veterinary Society. June 2-5, 2002 Ames, Iowa USA, 366;
7. De Luca S., Nicholson P., Magistrali C., García-Martín A., Rychener L., Zeeh F., Frey J., Perreten V. Transposon-associated lincosamide resistance *Inu(C)* gene identified in *Brachyspira hyodysenteriae* ST83. *Veterinary Microbiology*, Volume 214, 2018, Pages 51-55;
  8. Fellstrom C., Patterson B., Thomson, Gunnarson A., Persson M., Johansson K.E. (1997) – Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35: 462-467.
  9. Gasparini S, Alborali GL, Pitozzi A, Guarneri F, Giacomini E, Baldo V, Scali F, Lazzaro M, Boniotti MB. Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. *J Appl Microbiol.* 2017 Aug;123(2):340-351;
  10. Glock R. D., Harris D. L.: Swine Dysentery II. Characterization of Lesions in Pigs Inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in Pure and Mixed Culture. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1972, 67: 65–68.
  11. Kirchgässner, C., Schmitt, S., Borgström, A., & Wittenbrink, M. M. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 158(6), 405-410.
  12. Karlsson M, Fellström C, Heldtander MU, Johansson K-E, Franklin A: Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 172:255–260.
  13. Karlsson M, Fellström C, Johansson KE, Franklin A: Antimicrobial resistance in *Brachyspira pilosicoli* with special reference to point mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance. *Microb Drug Resist* 2004, 10:204–208.
  14. Harris D. L., Glock R. D., Christensen C. R., Kinyon, J. M.: Swine Dysentery I, Inoculation of Pigs with *Treponema hyodysenteriae* (New Species) and Reproduction of Disease. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1972b, 67: 61–64.
  15. Hidalgo À., Carvajal A., García-Feliz C., Osorio J., Rubio P.: Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 2009, 87: 7–12
  16. Yeh, J. C., Lo, D. Y., Chang, S. K., & Kuo, H. C. (2018). Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Brachyspira* Species Isolated in Taiwan. *Microbial Drug Resistance*, 24(5), 685-692.
  17. La, T., Collins, A. M., Phillips, N. D., Oksa, A., & Hampson, D. J. (2006). Development of a multiplex PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Letters in applied microbiology*, 42(3), 284-288.
  18. Leser T.D., Moller M., Jensen T.K., Jorsal S.E. (1997) - Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol. Cell. Probs* 11:363-372.
  19. Meriardi 2013: Coliti da *Brechyspira* in „Le patologie del maiale.“ a cura di Martelli P. *Le Point Vétérinaire Italie*, Milano (2013).
  20. Pringle M, Fellström C, Johansson KE: Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 2007, 123:245–248.
  21. Pringle M., Landén A., Unnerstad H. E., Molander B., Bengtsson B.: Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated

- in Sweden between 1990 and 2010. *Acta Vet. Scand.* 2012, 54
22. Rohde J., Kessler M., Baums C. G., Amtsberg G.: Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* 2004, 102: 25–32
  23. Rønne H., Szancer J. (1990). “In vitro susceptibility of danish isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery therapy. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.* 1990, 126.
  24. Rugna G., Bonilauri P., Carra E., Bergamini F., Luppi A., Gherpelli Y., Magistrali C.F., Nigrelli A., Alborali G.L., Martelli P., La T., Hampson D.J., Meriardi G. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003–2012. *The Veterinary Journal*, Volume 203, Issue 1, 2015, Pages 115-119.
  25. Šperling, D., Smola, J., & Čížek, A. (2011). Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Veterinary Record*, 168(8), 215-215.
  26. Tasker J. B., Winkelman N. L. & Kirwan P. (2004) Use of aivlosin in feed for control of ileitis in USA and Europe. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress. Hamburg, June 27 to July 1, 2004.* p 256.
  27. Taylor D.J., Alexander T.J.L. (1971) “The production of dysentery in swine by feeding coltures containing a spirochaete”. *Br. Vet. J.*, 127, 58-61;
  28. Wannemueler M.J. (1993) «Entèrite hèmorragique du porc: depistage et ètude clinique». *Rec. Med. Vet.*, 169 (8/9), 703-707.
  29. Verlinden M, Boyen F, Pasmans F, Garmyn A, Haesebrouck F, Martel A: Antimicrobial susceptibility pattern of *Brachyspira intermedia* isolates from European layers. *Microb Drug Resist* 2011, 17:485–488.
  30. Zmudzki, J., Szczotka, A., Nowak, A., Strzelecka, H., Grzesiak, A., & Pejsak, Z. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from 21 Polish farms. *Polish journal of veterinary sciences*, 15(2), 259-265.