



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Brachyspira hyodysenteriae – diagnostikmetoder och resistensmekanismer

Anna Gustafsson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:49

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Brachyspira hyodysenteriae – diagnostikmetoder och resistensmekanismer

Brachyspira hyodysenteriae – detection methods and resistance mechanisms

Anna Gustafsson

Handledare:

Susanna Sternberg Lewerin, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Monica Gustafsson

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:49
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Brachyspira hyodysenteriae, svindysenteri, detektionsmetoder, antibiotikaresistens, resistensmekanism, resistensbestämning

Key words: Brachyspira hyodysenteriae, swine dysentery, detection methods, antibiotic resistance, antibiotic susceptibility, resistance mechanism, susceptibility testing

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Att ta prover och detektera <i>B. hyodysenteriae</i>	3
Att samla in prover från besättning	4
Bakteriologisk odling	4
PCR	5
Serologisk detektion.....	5
Mekanismer bakom antibiotikaresistens	6
Resistensläget för <i>B. hyodysenteriae</i> i Sverige	6
Pleuromutiliner.....	6
Tylosin.....	7
Resistensbestämning av isolat.....	8
Diskussion	9
Litteraturförteckning	11

SAMMANFATTNING

Svindysenteri är en allvarlig diarré sjukdom inom grisproduktionen som orsakar lidande för djuren och ekonomiska kostnader för grisbönderna. Sjukdomen, som är spridd över hela världen, orsakas av den anaeroba bakterien *Brachyspira hyodysenteriae*. Tillståndet behandlas med antibiotika; i Sverige finns pleuromutiliner (tiamulin och valnemulin), tylosin samt tylvalosin godkänt för behandling av svindysenteri. I första hand rekommenderas ofta att använda pleuromutilinantibiotika, eftersom resistens är relativt vanligt och utvecklas snabbt mot tylosin. Tylvalosin tillhandahålls för närvarande inte i Sverige. Bakteriens resistensmekanism mot dessa antibiotika har visats bero på mutationer i de gener som kodar för ribosomen, som gör att läkemedlet inte längre kan binda in till denna och hindra proteinsyntesen.

Den diagnostikmetod som främst används för att påvisa bakterien hos en infekterad individ är bakteriologisk odling följt av biokemiska tester, men även PCR kan vara användbart. Fördelen med bakteriologisk odling är att metoden har hög sensitivitet, vilket ställer lägre krav på mängden bakterier i de faecesprover som undersöks; nackdelen är att det tar relativt lång tid. De serologiska tester som utvecklats för att påvisa infektion används inte i praktiken, eftersom de inte ger pålitliga resultat. För att resistensbestämma isolat kan man antingen använda agardilution- eller buljongdilution-metoden.

SUMMARY

Swine dysentery is an enteric disease of great importance to the swine production. It causes the animal suffering and substantial losses for the pig farmers. The illness, which is spread all over the world, is caused by the anaerobic bacterium *Brachyspira hyodysenteriae*. The condition is treated with antibiotics; in Sweden pleuromutilin antibiotics (tiamulin and valnemulin), tylosin and tylvalosin are approved for treatment of swine dysentery. Preferably, one should use pleuromutilin antibiotics, since resistance is relatively common and develops quickly against tylosin. Tylvalosin is currently not available in Sweden. The resistance mechanism against these antibiotics has been shown to be caused by mutations in the genes coding for the bacterial ribosome, which prevents the antimicrobial from binding to the ribosome and prevent protein synthesis.

The diagnostic method most frequently used to detect the bacteria from an infected animal is culture followed by biochemical tests, although PCR can also be a useful method. The advantage of culture is that the method has a high sensitivity, which means it does not require a high concentration of bacteria in the sample to be analyzed; the disadvantage is that the procedure is time consuming. The serological tests that have been developed to detect the infection are not in practical use, since they do not provide reliable results. To determine the antimicrobial susceptibility of an isolate, one can either use the agar dilution- or the broth dilution -method.

INLEDNING

Svindysenteri, som är en fekal-oral smitta, är en allvarlig diarrésjukdom bland grisar som orsakas av den anaeroba spiroketen *Brachyspira hyodysenteriae*. En infekterad gris kan vara frisk bärare av bakterien och utsöndra denna i upp till 3 månader, och blir därmed den främsta infektkällan för andra grisar. De djur som blir sjuka av bakterien drabbas av blodblandad diarré och förlorar aptiten, vilket gör att grisarna går ned kraftigt i vikt. Främst drabbas avvanda grisar i 6-12 veckors ålder. (Quinn et al., 2011). Mortaliteten är cirka 30% (Zachary & McGavin, 2012).

Sjukdomen förekommer över hela världen och orsakar lidande för djuren samt avsevärda ekonomiska förluster för grisbönderna. Möjligheten att behandla svindysenteri är begränsad, dels på grund av att det finns så få godkända antibiotika för grisar och dels för att bakterien börjar utveckla resistens mot dessa. I Sverige finns pleuromutilinantibiotika (tiamulin och valnemulin) och makroliderna tylosin och tylvalosin godkänt för behandling av grisar med *B. hyodysenteriae*-infektion (Läkemedelsverket, 2012). I första hand rekommenderas ofta att använda pleuromutilinantibiotika för behandling, eftersom resistens är relativt vanligt och utvecklas snabbt mot tylosin. Tylvalosin tillhandahålls för närvarande inte i Sverige. Svenska studier har visat att cirka 70% av alla *B. hyodysenteriae*-isolat som man undersökt de senaste åren är resistenta mot tylosin, men man ännu inte upptäckt resistens mot tiamulin hos något isolat (SVARM, 2011).

För att skydda våra djur och även i fortsättningen kunna bota deras sjukdomar är det viktigt att arbeta för minskad resistensutveckling. En del av det arbetet innebär att övervaka resistensförekomsten i landet och utifrån det sätta upp behandlingsstrategier, för vilket det behövs tillförlitlig diagnostik. I denna litteraturöversikt ville jag ta reda på vilka diagnostikmetoder som används för att påvisa *B. hyodysenteriae* i en infekterad besättning samt hur man resistensbestämmer de isolat man hittar. Jag har också tittat på resistensmekanismen bakom minskad antibiotikakänslighet för tiamulin och tylosin.

MATERIAL OCH METODER

För att finna information till denna litteraturöversikt användes databasen Web of Knowledge. Sökord som ”brachyspira hyodysenteriae OR swine dysentery” och ”pig* OR swine OR porcine” i kombination med ”detection OR diagnostic” eller ”antibiotic resistance OR antibiotic susceptibility” gav resultat i form av ett antal artiklar som var intressanta för mina frågeställningar. Dessutom refererade dessa artiklar till andra artiklar, som också blev till hjälp i detta arbete.

LITTERATURÖVERSIKT

Att ta prover och detektera *B. hyodysenteriae*

Fem arter av *Brachyspira* har beskrivits hos gris, varav två anses patogena: *B. hyodysenteriae*, som orsakar svindysenteri, och *B. pilosicoli*, som orsakar intestinal spiroketos.

För att kunna fastställa svindysenteri som diagnos måste man isolera och identifiera *B. hyodysenteriae* från de infekterade grisarna. Det är sällan något problem att påvisa bakterien hos en besättning med kliniska tecken på svindysenteri, men endast ett fåtal diagnostikmetoder är tillräckligt känsliga för att detektera subkliniskt infekterade grisar eller kunna avgöra huruvida en tillfrisknad individ fortfarande bär på och utsöndrar bakterien. Att kunna detektera även de infekterade djur som inte är i akutfasen av sjukdomen är viktigt vid bl.a. förflyttning av djur mellan besättningar, övervakning av åtgärdsinsatser mot sjukdomen och som en del av ett kontrollprogram inom en besättning. (Råsbäck et al., 2006; Fellström et al, 2001).

De vanligaste detektionsmetoderna för *B. hyodysenteriae* är, enligt Fellström et al. (2001), bakteriologisk odling och biokemiska tester, men även serologi och PCR (polymerase chain reaction) kan användas för att påvisa infektion.

Att samla in prover från besättning

I de studier som nämns i denna litteraturöversikt har man samlat in faeces, faecessvabbprover samt skrap-prover från mukosans epitel i colon, från de besättningar som undersöks, för diagnostik med bakteriologisk odling och PCR. För diagnostik med serologi behöver man blodprover.

Det kan finnas fördel med att poola svabbar, inför vidare provtagningsmoment, för att slippa utföra ett stort antal tester. I ett försök av Fellström et al. (2001) testade man att poola fem svabbar genom att inkubera dessa i en buljonglösning och sedan skaka om (s.k. vortexa). Från buljongen togs ett bomullsvabb-prov som sedan ströks ut på ett agarmedium för vidare analyser. Man undersökte 57 poolade prover, som representerade 285 rektalsvabbar från 23 besättningar. Resultatet blev att sensitiviteten inte minskade med poolade prover jämfört med individuella analyser. Man testade också att poola 10 prover, vilket resulterade i 30% falskt negativa resultat och att den kontaminerande mikrofloran blev störande.

Bakteriologisk odling

I en studie undersökte Fellström et al. (2001) hur länge man kunde detektera *B. hyodysenteriae* genom bakteriologisk odling från svabbar med faeces som inokulerats med olika koncentrationer fältisolat av den aktuella bakterien. När svabbproverna hade preparerats förvarades de i Amies transportmedium i tre dagar i rumstemperatur, för att simulera transportförhållanden till laboratoriet, och därefter i +4°C fram till dess att de odlades ut på agarplattor, vilket gjordes dag 1, 3, 7, 21, 42, 83 och 105. Man såg att sensitiviteten för diagnostikmetoden minskade med tiden. Från de prover som innehöll mer än 140 bakterier/g kunde bakterierna påvisas i tre veckor, medan från de prov som innehöll mer än $1,4 \cdot 10^6$ bakterier/g kunde bakterierna detekteras efter upp till 83 dagars förvaring. (Fellström et al., 2001).

Bakteriologisk odling med biokemiska tester har hög sensitivitet med låg detektionsgräns (Råsbäck et al., 2006). Nackdelen är att metoden är tidskrävande, eftersom spiroketer är långsamväxande; dessutom är de mycket känsliga för tillväxtförhållanden, vilket gör att

odling inte alltid är en pålitlig detektionsmetod (Atyeo et al., 1998). Ibland kan det vara svårt att skilja mellan olika närbesläktade *Brachyspira*-arter med hjälp av bakteriologisk odling och biokemiska tester, eftersom resultaten kan vara ottydliga (Råsbäck et al., 2006; Atyeo et al., 1998; Leser et al., 1997).

I en undersökning av Råsbäck et al. (2006) jämförde man bakteriologisk odling och biokemiska tester med PCR, för att testa hur många kliniska isolat med *B. hyodysenteriae* de båda metoderna kunde påvisa från rektalsvabbar som tagits i grisbesättningar med diarréproblem. Man utgick från 200 prover som ströks på agarplattor, och utförde sedan vidare analyser på de bakterier som växte på plattorna. Man fann att bakteriologisk odling påvisade fler positiva prover än PCR.

PCR

PCR-metoden har ofta hög specificitet men låg känslighet, vilket innebär att det behövs höga halter av bakterien i de faecesprover som används för att få ett positivt resultat, men att detta resultat oftast är tillförlitligt (Fellström et al., 2001). Råsbäck et al. (2006) visade att PCR för DNA som extraherats direkt från faeces har 1000 gånger lägre känslighet jämfört med bakteriologisk odling och biokemiska tester. En viktig fördel med PCR är att det tar kort tid att få resultat jämfört med bakteriologisk odling (Råsbäck et al., 2006).

Man har tagit fram flera olika PCR-metoder för att påvisa olika avsnitt av genomet hos *B. hyodysenteriae*, bl.a. kan man detektera delar av 23S rRNA-, nox- och *tlyA*-genen (Leser et al., 1997; Atyeo et al., 1999; Fellström et al., 2001).

Även om känsligheten är relativt låg när man undersöker DNA från faecesprover, kan PCR med DNA som extraherats ur en renkultur ge mycket hög känslighet och vara ett bra komplement till bakteriologisk odling för påvisande av bakterien. När Råsbäck et al. (2006) undersökte en PCR-metod med *tlyA*-genen som målsekvens, testade man detektionsgränsen för både faecesprover och renkulturer av *B. hyodysenteriae*. Man fann att detektionsgränsen var högre för faecesproverna. Lester et al. (1997) menar att den lägre sensitiviteten beror på svårigheter att extrahera rent DNA från faeces och att PCR-inhibitorer finns kvar under analysen. Atyeo et al. (1998) menar dock att, trots att det tar längre tid för påvisande av bakterien, så kan det vara en bra idé att odla ut faecesproverna till en renkultur innan PCR, eftersom denna kultur sedan behövs för ytterligare analyser såsom resistensbestämning.

Serologisk detektion

Serologiska tester kan i teorin vara till stor nytta för att diagnosticera infekterade grisar som tillfrisknat från svindysenteri men ännu är bärare av *B. hyodysenteriae*, eftersom dessa detektionsmetoder inte är beroende av att bakterien utsöndras i tillräckligt stor mängd i faeces (La & Hampson, 2001). Vid infektion med *B. hyodysenteriae* ger immunförsvaret upphov till en mängd antikroppar som cirkulerar med blodet, och finns kvar i lägre halter även efter tillfrisknande (Joens et al., 1982).

Enligt en reviewartikel som skrivits av La & Hampson (2001) finns det dock inga specifika serologiska tester som är kommersiellt tillgängliga. Författarna menar att de metoder, som har utvecklats fram till det att artikeln skrevs, har haft påtagliga nackdelar: de tekniker som använder helcellsantigen ger många falskt positiva svar på grund av korsreaktivitet med proteiner som finns hos andra spiroketer, medan de tekniker som använder lipopolysackarid-antigen ger många falskt negativa resultat eftersom dessa komponenter kan vara serogruppspecifika. De metoder som finns är bl.a. hemagglutinationstest, komplementfixering och ELISA; generellt är de användbara för att påvisa en infekterad besättning, när man undersöker många prover, från flera individer, men ger sämre resultat för detektion av infektion på individnivå (La & Hampson, 2001).

Optimalt vore en metod som använder ett antigen som är specifikt för *B. hyodysenteriae*, men gemensamt för de olika stammarna inom arten. För att finna ett sådant antigen har man undersökt proteiner från yttre membranet av bakterien och dess flagell. (La & Hampson, 2001).

Mekanismer bakom antibiotikaresistens

Resistensläget för B. hyodysenteriae i Sverige

I en studie av Pringle et al. (2012) undersökte man antibiotikakänsligheten hos *B. hyodysenteriae*-isolat, från svenska grisbesättningar, som sändes in till SVA (statens veterinärmedicinska anstalt) mellan år 1990 och 2010. Man använde buljongdilutionsmetoden för att bestämma MIC (minimum inhibitory concentration)-värden för isolaten avseende tiamulin, valnemulin, tylosin, tylvalosin, doxycykline och lincomycin, d.v.s. man bestämde *in vitro* den lägsta koncentration som behövs av ett antibiotikum för att hindra tillväxt av bakterien i ett buljongmedium.

Pringle et al. (2012) menar att resistensläget för *B. hyodysenteriae* i Sverige är relativt gott; ur ett internationellt perspektiv är andelen isolat med minskad känslighet låg och har dessutom varit konstant över tid för de antibiotika man testat. Dock såg man en gradvis ökning av MIC för tiamulin mellan 1990 och 2003, men som sedan dess varit konstant (resultaten från 2004-2010 är jämförbara med dem från 2002-2003).

Pleuromutiliner

Tiamulin och valnemulin hämmar bakteriens proteinsyntes genom att binda till dess ribosom, specifikt till peptidyltransferascentret (Karlsson et al., 2001; Pringle et al., 2004). När Karlsson et al. (2001) undersökte MIC-värden för dessa antibiotika hos 50 svenska fältisolat av *B. hyodysenteriae*, genom buljongdilutionsmetoden, fann man att MIC för tiamulin var mellan 0 och 8 gånger högre än det för valnemulin hos de olika isolaten. Inga av de undersökta isolaten hade dock MIC-värden som var höga nog för att de skulle definieras som resistenta.

I en studie som genomfördes av Pringle et al (2004) försökte man visa på resistensmekanismen för tiamulin hos *Brachyspira* spp, genom att undersöka området för

tiamulins bindningsställe. Man sekvenserade delar av de gener som kodar för ribosomalt protein L3 och 23S rRNA i närheten av peptidyltransferascentret hos *Brachyspira*-isolat med minskad antibiotikakänslighet. Sekvenseringen visade på ett antal mutationer i de undersökta generna. Olika isolat hade olika uppsättningar av mutationer, vilket enligt författarna tyder på att förändrad tiamulinkänslighet kan uppnås på olika sätt. Man såg också att de isolat som hade flertalet mutationer hade högre tiamulin-MIC, och drog slutsatsen att en enkel punktmutation inte är tillräcklig för att ge upphov till en hög grad av resistens. I studien kunde man också visa att bindningen av tiamulin till ribosomen var sämre hos antibiotikaresistenta isolat. Sammantaget anser de som utförde studien att mutationerna vid tiamulins bindningsställe och den sämre bindningen till ribosomen förklarar den bakomliggande resistensmekanismen hos de *Brachyspira* spp.-stammar som man valt att undersöka. Författarna nämner också i sin artikel att det finns ytterligare resistensmekanismer att upptäcka, som inte påverkar tiamulins bindningsställe i ribosomen, eftersom denna förklaringsmodell inte verkar gälla för några av de fältisolat som man undersökt.

Tiamulinresistens uppstår relativt långsamt hos bakterien, eftersom flertalet stegvisa mutationer måste ske för att uppnå hög resistens (Karlsson et al., 2001). Kontinuerlig exponering med tiamulin kommer dock såsmåningom, enligt Karlsson et al. (2003), leda till att minskad känslighet utvecklas hos *B. hyodysenteriae* vilket sannolikt gör att man inte längre kan behandla infektionen. Karlsson et al. (2001) visade i ett försök att *Brachyspira* spp. kan förvärva tiamulinresistens *in vitro* genom att exponeras för detta antibiotikum under en längre tid. I försöket undersöktes två isolat *B. hyodysenteriae* och två isolat *B. pilosicoli*, som man lät växa på agarmedium med allt högre koncentrationer av tiamulin. Två gånger i veckan ströks isolaten på ny agar, och när man uppnått riklig tillväxt dubblerades koncentrationen av tiamulin. Resistensen uppstod långsamt. För tre av de undersökta stammarna hade MIC-värdet för tiamulin ökat till >500 gånger det ursprungliga värdet (från 0,031-0,25 till >128 µg/ml), under loppet av mer än 60 passager. En stam genomgick endast 29 passager, men dess tiamulin-MIC hade ökat med en faktor >300 (från 0,025 till 4 µg/ml).

Tylosin

Tylosin är ett makrolidantibiotikum och verkar genom att hindra bakteriens proteinsyntes. Resistens mot denna grupp av antibiotika är vanligt och globalt utbredd, något som enligt Karlsson et al., (2003) inte är överraskande eftersom den frekventa användningen av tylosin, både som läkemedel och tillväxtbefrämjande substans i stora delar av världen, har utgjort ett selektionstryck för bakterien. Enligt SVARM 2011 är strax över 70% av alla *B. hyodysenteriae*-isolat i Sverige resistenta mot tylosin.

I en undersökning för att ta reda på resistensmekanismen för tylosin hos *B. hyodysenteriae*, som gjordes av Karlsson et al. (1999), testade man sju makrolid/linkosamid-resistenta *B. hyodysenteriae*-stammar och lika många känsliga med avseende på nukleotidsekvensen som kodar för peptidyltransferasregionen i 23S rDNA. Man använde svenska fältisolat och referensstammar av bakterien som resistensbestämdes med buljongdilutionmetoden, för att ta reda på MIC-värden, innan man extraherade DNA och amplifierade den aktuella gensekvensen med hjälp av PCR; därefter sekvenserades PCR-produkten. Resistenta stammar

definierades som de med 16 gånger högre MIC-värde än de känsliga stammarna. Man fann en punktmutation i 23S rRNA-genen hos samtliga resistenta, men inga av de känsliga, stammarna. En enkel mutation i den konserverade delen av 23S rRNA orsakar en konformationsändring som hindrar makrolidantibiotika från att binda till sin målstruktur

Karlsson et al (1999) har kunnat visa att känsliga *B. hyodysenteriae*-stammar kan förvärva resistens *in vitro* genom att under en viss tidsperiod exponeras för låga koncentrationer av tylosin. I försöket lät man två mottagliga stammar växa på ett agarmedium som innehöll 4µg/ml tylosin, och strök om dessa till en ny agarplatta var tredje dag. Efter fyra passager gjordes ett nytt antibiotikaresistenstest. Man fann att makrolidresistens hade uppstått på mindre än två veckor, eftersom en mutation i 23S rRNA-genen hade skett.

Resistensbestämning av isolat

Det finns för tillfället ingen standardiserad metod för att testa antibiotikakänslighet hos *Brachyspira* spp. Enligt Karlsson et al. (2003) har de flesta rapporter använt agardilutionsmetoden för att bestämma antibiotikakänslighet hos *Brachyspira*-arter, något som författarna menar kan vara en nackdel jämfört med buljongdilutionsmetoden eftersom "end points" ibland avläses som avsaknad av hemolys snarare än hämning av synlig bakterietillväxt. Hemolys kan hos vissa stammar hämmas av antibiotikakoncentrationer som är lägre än de som hämmar tillväxt. Författarna menar också att förutsättningarna för testerna har varierat i dessa rapporter avseende bland annat typ av medium, inkubationstid och mängd inokulat, vilket har gjort resultaten svåra att jämföra. De anser att det är väsentligt att ha pålitliga resultat som är jämförbara mellan laboratorier.

I en studie av Karlsson et al. (2003) ville man utveckla och utvärdera en dilutionsmetod med buljong för att bestämma antibiotikakänslighet. Man testade den antimikrobiella aktiviteten hos 108 isolat av olika *Brachyspira*-arter från svenska grisbesättningar. Buljongdilutionsmetoden gav reproducerbara resultat, var enkelt att utföra och hade "end points" som var lätta att läsa. Man satte samman en panel för att testa antibiotikakänsligheten för tiamulin, tylosin, virginiamycin och carbadox, eftersom de används eller har använts för att behandla svindysenteri i Sverige, samt erythromycin, som representerade makrolidantibiotika, och clindamycin, som representerade linkosamidantibiotika. Olika koncentrationer av respektive antibiotika torkades på en platta med 48 brunnar och förpackades därefter i foliepåsar med lufttät försegling. Man testade dessa antibiotika-dilutioner med kontrollstammar av olika bakteriearter, som rekommenderas av NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, www.clsi.org), och undersökte även panelplattornas hållbarhet. Buljongdilutionsmetoden går till så att man suspenderar de aktuella bakterierna i en buljonglösning, till en koncentration av $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ CFU/ml, som sedan används för att fylla brunnarna i antibiotikapanelen. Efter att plattorna inkuberats i 4 dagar i anaerob miljö i 37°C kunde MIC avläsas som den lägsta koncentrationen av det antimikrobiella ämnet som hindrade synlig tillväxt. En brunn i varje panel innehöll inte något antibiotikum, utan användes som tillväxtkontroll och för jämförelse med de andra brunnarna.

I studien av Karlsson et al. (2003) undersökte man också huruvida det MIC-värde man kom fram till för ett isolat skiljde sig beroende på om man tagit fram det med buljong eller olika agartyper (TSA agar och WC-agar); MIC-värdena tenderade att vara lägre för buljong, förutom för carbadox, och resultatet var något svårare att läsa av från agarodling eftersom man ibland inte kunde se någon tydlig tillväxt. Man testade även om inokulationsdensiteter och inkubationstider påverkade resultatet; högre inokulationsdensiteter kunde ge något högre MIC-värde, medan längre inkubationstider inte verkade ha någon påverkan på resultatet.

DISKUSSION

Syftet med denna litteraturöversikt var att redogöra för de vanligast förekommande diagnostikmetoderna för *B. hyodysenteriae* samt hur isolat av denna bakterie resistensbestäms, och vilka mekanismer som ligger bakom eventuellt minskad antibiotikakänslighet. Jag har besvarat dessa frågeställningar, om än något översiktligt. Ämnet är viktigt eftersom pålitliga diagnostikmetoder är en förutsättning för att kunna hantera sjukdomen.

Den största risken för introduktion av bakterien till en besättning är genom handel med levande djur, eftersom en individ kan infekteras av *B. hyodysenteriae* och utsöndra denna bakterie i faeces utan att visa symptom. Man har ännu inte kommit fram till en serologisk metod som har tillräckligt hög sensitivitet och specificitet för att kunna användas i praktiken. Ytterligare forskning behövs då förutsättningarna finns för att denna metod ska vara mycket användbar eftersom man kan påvisa att en infektion skett hos en individ även efter att bakterier inte längre urskiljs i hög koncentration med faeces. Bakteriologisk odling med biokemiska tester är den metod som idag har bäst möjlighet att detektera de subkliniskt infekterade individerna, eftersom studier visat på att denna metod har låg detektionsnivå och god förmåga att detektera *B. hyodysenteriae* i kliniska prover. Även PCR är en användbar metod för att påvisa denna bakterie, under förutsättningen att man först odlar ut sitt faecesprov till en renkultur innan provtagningen. När man odlar sitt kliniska prov förlorar PCR sin främsta fördel, nämligen att metoden ger ett snabbt resultat. Mest tidseffektiv metod är PCR när man analyserar DNA som extraherats direkt från faecesprover. Tyvärr innebär denna snabbare metod att detektionsgränsen för bakterien stiger och sannolikheten är därför liten att man skulle kunna påvisa en individ som utskiljer ett lågt antal bakterier i faeces. Dock kan metoden vara användbar för att påvisa bakterien hos kliniskt infekterade individer som utsöndrar en stor mängd bakterier. PCR-metoder har hög specificitet och ett positivt resultat med denna metod är ofta mer tillförlitlig än med bakteriologisk odling, eftersom bakterierna är mycket känsliga för tillväxtförhållanden och de biokemiska testerna kan ge otydligt resultat som gör det svårt att skilja mellan närbesläktade stammar. Säkrast resultat får man om man kombinerar bakteriologisk odling och PCR, genom att konfirmera positiva svar från bakteriologisk odling med PCR.

Resistensläget för de antibiotika som är godkända för behandling av svindysenteri i Sverige är relativt gott, trots att en hög andel av isolaten är resistent mot tylosin. Det är viktigt att man fortsätter arbeta för en minskad antibiotikaanvändning och att de behandlingsstrategier som finns är välplanerade, så att läget förblir stabilt. Den gradvis minskande känslighet som *B.*

hyodysenteriae uppvisade mot tiamulin mellan åren 1990 och 2003 har avstannat, vilket tyder på att arbetet för att bevara de antibiotika vi har verkar fungera. När svindysenteri påvisas i en svensk grisbesättning bör ett saneringsprogram initieras, vilket bl.a. innebär tömning, tvättning och desinficering av de stallar där grisarna finns. Innan grisarna sätts tillbaka in i den rengjorda avdelningen ska de tvättas och behandlas med antibiotika (Läkemedelsverket, 2012). Innan man påbörjar antibiotikabehandling bör man ta reda på resistensmönstret för bakterien, så att man behandlar infektionen effektivt under så kort tid som möjligt. Undersökningar har visat att buljongdilutionsmetoden verkar vara en bra och säker metod för att resistensbestämma isolat. Eftersom studier har visat att resistens utvecklas hos både tylosin och tiamulin vid långvarig exponering för subinhibitoriska koncentrationer av antibiotika finns risk att man främjar resistensutveckling hos *B. hyodysenteriae* om man inte behandlar på rätt sätt. Särskilt gäller det tylosin, eftersom bakterien endast behöver genomgå en punktmutation vid tylosins bindningsställe på ribosomen för att bli resistent. Mekanismen bakom tiamulinresistens är mer komplicerad; studier har visat att hos vissa isolat med minskad tiamulinkänslighet verkar mutationer i bindningsstället på ribosomen vara den aktuella resistensdeterminanten, men det finns ytterligare mekanismer att upptäcka och det behövs därför mer forskning för att kunna detektera dessa.

Sammantaget är svindysenteri en allvarlig sjukdom som det är viktigt att ha goda diagnostikmetoder för, varav bakteriologisk odling och PCR är de som främst används idag. Idag är cirka 70% av isolaten resistent mot tylosin, men man har ännu inte funnit något isolat med tiamulinresistens. För att värna om Sveriges relativt sett goda resistensläge behövs övervakning av *B. hyodysenteriae*-isolatens antibiotikakänslighet över tid, något som man använder buljongdilutionsmetoden för.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Combs, B.G. & Hampson, D.J. (1998). Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 126-130.
- 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. *Veterinary Microbiology*, vol 56 no 1, 47-60.
- Fellström, C., Zimmerman, U., Aspan, A. & Gunnarsson, A. (2001). The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Animal Health Reserarch Reviews*, 2(1); 37-43.
- Joens, L.A., Nord, N.A., Kinyon, J.M. & Egan, I.T. (1982). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibody to *Treponema hyodysenteriae* Antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 15 no 2, 249-252.
- Karlsson, M., Fellström, C., Gunnarsson, A., Landén, A. & Franklin, A. (2003). Antimicrobial Susceptibility Testing of Porcine *Brachyspira (Serpulina)* Species Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 41 no 6, 2596-2604.
- Karlsson, M., Fellström, C., Heldtander, M.U.K., Johansson, K. & Franklin, A. (1999). Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *FEMS Microbiology Letters*, 172, 255-260.
- Karlsson, M., Gunnarsson, A. & Franklin, A. (2001). Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Animal Health Research Reviews*, 2(1); 59-65.
- La, T. & Hampson, D.J. (2001). Serologic detection of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* infections. *Animal Health Reserarch Reviews*, 2(1); 45-52.
- Lester, T.D., Møller, K., Jensen, T.K. & Jorsal, S.E. (1997). Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly β -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA *Molecular and Cellular Probes*, 11, 363-372.
- Läkemedelsverket. (2012). Information från läkemedelsverket. Dosering av antibiotika till gris – ny rekommendation. Årgång 34, supplement 1:2012. Taberg Media Group AB, 2012. Uppsala. ISSN 1101-7104.
- Pringle, M., Landén, A., Unnerstad, H.E., Molander, B. & Bengtsson, B. (2012). Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54:54.
- Pringle, M., Poehlsgaard, J., Vester, B. & Long K. S. (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. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1295-1306.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2 uppl. Singapore. Ho Printing Singapore Pte Ltd.
- 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*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 347-353.

SVARM 2011, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2012. www.sva.se, ISSN 1650-6332

Zachary, J.F. & McGavin, M.D. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5 uppl. St. Louis, Missouri. Moseby, Inc., and affiliate of ELSEVIER inc.