

Slutrapport Projnr H1150149

Test av antibiotikakänslighet hos *Dichelobacter nodosus* isolerade från får med fotröta

Bakgrund

Fotröta hos får är en infektionssjukdom som orsakar både lidande för djuren och ekonomiska förluster. De första symtomen är hudförändringar i klövspalten men rötan kan i allvarliga fall sprida sig under sulhornet som helt kan lossna. Skadorna är ofta smärtsamma och leder då till att djuren blir halta. Sjukdomen kan enligt vissa forskare orsakas enbart av *Dichelobacter nodosus* men troligen är fler bakterier ofta inblandade i symtomutvecklingen som *Fusobacterium* spp. och *Treponema* spp. Gemensamt för dessa bakterier är att de är anaeroba och extra krävande vid odling varför det endast finns ett fåtal studier publicerade om deras antibiotikakänslighet. Bäst studerad är *Fusobacterium* spp. I de rapporter som finns är känsligheten för de flesta antibiotika hög men för *D. nodosus* finns till exempel tetracyklinresistens och penicillinresistens rapporterad från Spanien (Jimenez m fl, 2004).

I Sverige pågår ett kontrollprogram mot fotröta (www.svdhv.org; König m fl, 2010) och sjukdomen är anmälningspliktig. Vid sanering av en fotrötebesättning används antibiotika endast till de allvarliga fallen. Istället använder man sig av fotbad med zinksulfat, förflyttning av djur till smittfria ytor samt att kroniska smittbärare identifieras och slaktas. Det vanligaste valet av antibiotika är idag en injektion med ett långverkande tetracyklinpreparat. I andra länder med stor fårproduktion som till exempel Storbritannien används avsevärt mycket mer antibiotika både som lokal- och allmänbehandling (Wassink m fl, 2010).

Vi har tidigare inte haft någon metod för resistensbestämning av *D. nodosus* i Sverige. Målet med det här projektet var att ta fram en metod för resistensbestämning och resistensdata för fältisolat av *D. nodosus*.

Material och metoder

Den metod som beskrivs i ansökan, mikrodilution i VetMIC-paneler, visade sig inte fungera. Inledningsvis gjordes tester med typstammen av *D. nodosus* (CCUG 27824). Stammen växte bra i TAS-buljong (Trypticase Arginine Serine) men denna buljong var för grumlig för att resistenstestet skulle kunna läsas av. Det här löstes dock genom att kalciumklorid uteslöts som ingrediens vilket gick att göra utan att tillväxten påverkades. Tester med den modifierade buljongen och typstammen i mikrodilutionsplattor såg lovande ut (Bild 1).

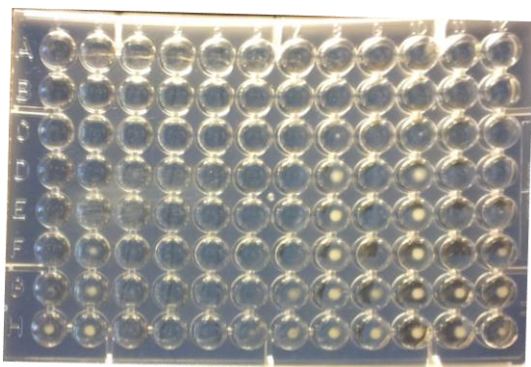


Bild 1. Mikrodilutionsplatta med typstammen av *D. nodosus*. I de brunnar som en ljus pellet syns har bakterien växt till. Antibiotikaspädningarna är gjorda i stigande koncentrationer nedifrån och upp i varje rad.

Testet gav en tydlig skillnad på växt eller inte växt vilket är kriteriet för att läsa av MIC (minimal inhibitory concentration eller minsta hämmande koncentration) som är det värde man vanligen använder för att mäta känsligheten för antibiotika. När vi sedan började testa fältisolat av *D. nodosus* visade det sig tyvärr att endast vissa isolat växte i mikrodilutionsplattorna. Att bara testa de isolat som växer i buljong i mikrodilutionsplattor skulle innebära en risk att selektera för en viss typ av *D. nodosus*-isolat så dessa tester avbröts.

Eftersom diskdiffusion inte rekommenderas för anaeroba bakterier fanns bara ett alternativ kvar, agardilution. Denna metod innebär att antibiotika blandas i tvåstegsspädningar ($\mu\text{g/ml}$) i varm flytande agar innan plattorna gjuts och att sedan en uppslamning av bakterierna sätts som små droppar på agarplattorna. Efter inkubering läses plattorna av för växt eller ej och MIC kan bestämmas. Denna metod är betydligt mer arbetskrävande än mikrodilution då en platta måste gjas för varje koncentration som ska testas. På grund av det valdes endast fyra antibiotika ut och testades till att börja med i 33 koncentrationer totalt (dvs 33 plattor per omgång). Efter några testomgångar erhöles kunskap om normala värden för *D. nodosus* och då kunde antalet koncentrationer minskas något.

Artidentifiering

Målsättningen var att testa ett isolat per besättning insamlade i det SLF-finansierade projektet: ”Fotröta hos får – karakterisering av svenska bakteriestammar och identifiering av virulensmarkörer” (H1050142). Därefter valdes ett isolat per besättning ut från SVAs stamförråd från kliniska prover löpande bakåt i tiden vilket resulterade i att det äldsta isolatet i studien är från 2007. Majoriteten av de isolat som togs upp från frys levde och innehöll *D. nodosus* även om inte alla var rena. Rena isolat med typiskt utseende och typisk lukt som tidigare artbestämts med hjälp av PCR (Frosth m fl, 2012) betraktades direkt som *D. nodosus* medan övriga identifierades med hjälp av MALDI-TOF (Matrix-assisted-laser-desorption-ionization Time-of-flight). Som en parentes i den här slutredovisningen kan nämnas att MALDI-TOF-metoden har inneburit en ännu pågående revolution inom diagnostik av bakterier från både människor och djur. Vid SVA har vi valt en MALDI Biotyper från Bruker. Många veterinärmedicinskt intressanta bakterier saknas i MALDI-TOF-databaserna och i samarbete med Bruker inkluderade vi i det aktuella projektet *D. nodosus* i databasen genom att skicka sex välkarakteriserade stammar till företaget. För de isolat som identifierats med hjälp av den nya MALDI-TOF-databasen i det här projektet har tekniken fungerat. Med andra ord en bonuseffekt av projektet.

Agardilution

Känslighetstesterna utfördes på fastidious anaerob agar med 10% hästblod (FAA) (Bild 2). Enrofloxacin, erytromycin, penicillin och tetracyklin tillsattes till agar i tvåstegspädningar. Som kontrollstammar användes *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 och *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. Direktsuspensioner från FAA-plattor (för *D. nodosus* tre dagar gamla kulturer och för *B. fragilis* övernattskulturer) och blodagarplattor (*S. aureus* övernattskultur) användes för inokulering av plattorna. För *D. nodosus* och *B. fragilis* användes en suspension med densiteten 0,5 McFarland (ca 10^5 CFU per droppe) och för *S. aureus* en tiospädning lägre (ca 10^4 CFU per droppe). Plattorna inkuberades fyra dagar i anaerobklockor i 37° C. MIC avlästes som den första koncentrationen som hade en markant minskning av växt i jämförelse med kontrollplattan. Testerna gjordes i duplikat och lästes av samma person. Typstammen för *D. nodosus*, CCUG 27824, ingick vid nio testtillfällen.

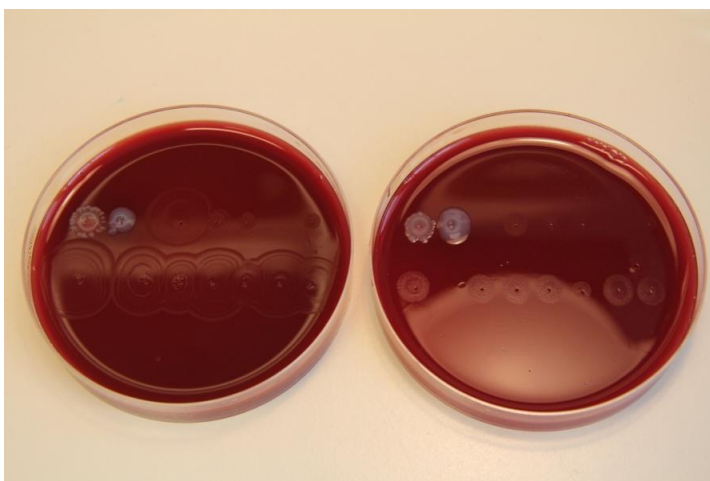


Bild 2. Agardilutionsplattor med 11 fältisolat av *D. nodosus* och två kontrollstammar (*Staphylococcus aureus* och *Bacteroides fragilis*)

Resultat

Totalt kunde MIC för fyra antibiotika för 43 isolat av *D. nodosus* användas till en sammanställning (Tabell 1). Av dessa var 39 från får i besättningar med kliniska tecken på fotröta och 4 från besättningar utan fotröta. Isolat som inte var rena i båda testerna eller med osäker artidentifiering sorterades bort.

För vissa isolat-antibiotikakombinationer var MIC svårt att avläsa eftersom växten avtog gradvis. Av 172 lästa MIC skilde sig 155 mindre än två tvåstegspädningar när första och andra testet jämfördes. Den största andelen varierande resultat sågs för erytromycin och penicillin men för typstammen sågs mest variation för enrofloxacin och penicillin.

Tabell 1. Distribution (%) av MIC för fyra antibiotika för 43 isolat av *Dichelobacter nodosus*.

Substans	Distribution (%) av MIC ^a (mg/L)										
	≤0,004	0,008	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4
Enrofloxacin			5	44	33	16	2				
Erytromycin			14	12	23	30	19			2	
Penicillin		2	35	14	21	2	26				
Tetracyklin						14	30	40	14		2

^aVita rutor motsvarar det intervall av koncentrationer som testats av varje substans. MIC som är högre än de testade koncentrationerna är angivna som den första koncentrationen över testintervallet. MIC som är mindre än eller lika med den lägsta testade koncentrationen är angivna som den lägsta testade koncentrationen.

Diskussion

Trots svårigheterna med att tolka resultaten för erytromycin och penicillin för en del av isolaten låg majoriteten av lästa MIC inom det accepterade metodfelet för agardilution när testet upprepades. Förhöjda MIC av erytromycin och tetracyklin hittades endast för ett isolat som även visade sig bära på en nyligen beskriven virulensgen *aprV2* som anses vara en god markör för om en stam orsakar allvarlig fotröta eller ej (Kennan m fl, 2010).

Sammanfattningsvis hade majoriteten av *D. nodosus*-isolaten hög känslighet för enrofloxacin, erytromycin, penicillin och tetracyklin.

Ett syfte med studien var att undersöka om penicillin, vilket skulle vara ett bättre val än tetracyklin ur ett antibiotikaresistensperspektiv, skulle kunna vara ett alternativ för behandling av fotröta. Resultaten för penicillin i den här studien tyder på att bakterien skulle vara behandlingsbar. Men förutom låga MIC behövs kliniska studier för att visa om penicillin är effektivt mot fotröta.

Publikationer

På grund av att endast agardilution gav tillfredställande resultat minskade mängden information som projektet kunde ge avsevärt och antalet testade bakterieisolat och antalet antibiotika bedömdes vara för litet för att publicera i en internationell vetenskaplig tidskrift. Vid denna bedömning vägdes även svårigheterna att läsa av agardilutionsresultaten in, vilka för vissa isolat (inklusive typstammen) resulterade i stor variation. Istället sammanställdes resultaten som en posterpresentation vid den enda internationella konferensserien som fokuserar på just klövsjukdomar:

S Frosth, E Bagge, K Ekström, H Ericsson Unnerstad & M Pringle. Antimicrobial susceptibility testing of *Dichelobacter nodosus*. Lameness in Ruminants, 17th International Symposium & 9th International Conference, August 11-14 2013, Bristol, UK. pp 220-221.

Övrig resultatförmedling till näringen

Projektet har presenterats på SVAs webbsida bland aktuella forskningsprojekt:
(www.sva.se/sv/Forskning-och-produkter/Aktuella-forskningsprojekt/Test-av-antibiotikakanslighet-hos-Dichelobacter-nodosus-isolerade-fran-far-med-fotrota/)

och på Svenska Djurhälsovårdens fårsidor:
(www.svdhv.org/upload/documents/Far/projekt/121212_far_projekt_dichelobacter_mic.pdf.)

En sammanfattning av resultaten kommer att publiceras i tidningen Djurhälsonytt under hösten 2013.

Resultaten kommer också att ingå i den årliga rapporten SWEDRES/SVARM (Swedish Antibiotic Utilisation and Resistance in Human Medicine/Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) för 2013 som publiceras i mitten av år 2014 (www.sva.se/sv/Merom-SVA1/Publikationer/Antibiotikaresistens/SVARM-rapporter/).

Referenser

Jimenez, R., Piriz, S., Mateos, E., Vadillo, S., 2004, Minimum inhibitory concentrations for 25 selected antimicrobial agents against *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium* strains isolated from footrot in sheep of Portugal and Spain. J Vet Med B 51, 245-248.

Frosth, S., Slettemeas, J.S., Jorgensen, H.J., Angen, O., Aspan, A., 2012, Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. Acta Vet Scand 54, 6.

Kennan, R.M., Wong, W., Dhungyel, O.P., Han, X., Wong, D., Parker, D., Rosado, C.J., Law, R.H., McGowan, S., Reeve, S.B., Levina, V., Powers, G.A., Pike, R.N., Bottomley, S.P., Smith, A.I., Marsh, I., Whittington, R.J., Whisstock, J.C., Porter, C.J., Rood, J.I., 2010, The subtilisin-like protease AprV2 is required for virulence and uses a novel disulphide-tethered exosite to bind substrates. PLoS Pathog 6, e1001210.

König U, Björk Averpil H, Sanering av fotröta i svenska fårbesättningar, 2010, Svensk Vet Tidn 10, 11-18.

Wassink, G.J., King, E.M., Grogono-Thomas, R., Brown, J.C., Moore, L.J., Green, L.E., 2010, A within farm clinical trial to compare two treatments (parenteral antibacterials and hoof trimming) for sheep lame with footrot. Prev Vet Med 96, 93-103.