

Gevoeligheid van Belgische *Mycoplasma hyopneumoniae*-isolaten voor antimicrobiële middelen

In vitro susceptibilities of Mycoplasma hyopneumoniae field isolates

¹D. Maes, ^{1,2}J. Vicca, ³T. Stakenborg, ^{2,3}P. Butaye, ¹A. de Kruif, ²F. Haesebrouck

¹Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde,

²Department Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten,

Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke België

³Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Groeselenberg 99, B-1180 Ukkel

Dominiek.maes@UGent.be

SAMENVATTING

Van 21 *Mycoplasma hyopneumoniae*-isolaten die in België verzameld werden tussen 2000 en 2002, werd de gevoeligheid bepaald voor 12 antimicrobiële middelen die frequent worden gebruikt in de varkenshouderij. Hierbij werd gebruik gemaakt van een microdilutietechniek. Verworven resistentie tegen spectinomycine, oxytetracycline, doxycycline, gentamicine, florfenicol en tiamuline werd niet waargenomen. Eén isolaat was zowel resistent tegen lincomycine als tegen filmicosine en tylosine, maar gevoelig voor alle andere geteste antimicrobiële middelen. De minimale inhibitorische concentratie (MIC)-waarden van flumequine waren $> 16 \mu\text{g/ml}$ voor 5 isolaten, terwijl de MIC^{50} $2 \mu\text{g/ml}$ bedroeg. De MIC-waarden voor enrofloxacin waren $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ voor deze 5 isolaten, terwijl de MIC^{50} $0,06 \mu\text{g/ml}$ bedroeg. Dit is de eerste studie die verworven resistentie aantoont tegen macroliden, lincosamiden en fluoroquinolonoln bij *M. hyopneumoniae*.

ABSTRACT

To control *Mycoplasma hyopneumoniae* infections, the use of antibiotics in feed or water is a common practice. Unfortunately, information concerning the susceptibility of *M. hyopneumoniae* to different antimicrobials is very scarce. The *in vitro* susceptibility of 21 *M. hyopneumoniae* field isolates was determined in this study using a broth microdilution technique. Acquired resistance to spectinomycin, oxytetracycline, doxycycline, gentamicin, florfenicol and tiamulin was not observed. One isolate showed acquired resistance to lincomycin, tilmicosin and tylosin, but was susceptible to all other antibiotics tested. For 5 isolates, the MIC-values of flumequine were $> 16 \mu\text{g/ml}$, while the MIC^{50} -value was $2 \mu\text{g/ml}$. The MIC-values of enrofloxacin for these 5 isolates were $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$, the MIC^{50} being $0.06 \mu\text{g/ml}$. This is the first report showing acquired resistance against macrolides, lincosamides and fluoroquinolones in *M. hyopneumoniae* field isolates.

INLEIDING

Mycoplasma hyopneumoniae is het primaire agens van enzoëtische pneumonie, een chronische ademhalingsaandoening bij varkens die grote economische schade veroorzaakt. Alhoewel vaccinatie tegen de aandoening zeer veel toegepast wordt, wordt ook nog frequent gebruik gemaakt van antimicrobiële middelen om de infectie onder controle te houden. Het gebruik van antimicrobiële middelen kan echter leiden tot de selectie van resistente bacteriën, zowel pathogenen als kiemen die behoren tot de normale microflora. De ge-

voeligheid van *M. hyopneumoniae*-isolaten voor verschillende antimicrobiële middelen werd tot dusver zelden bepaald. Bovendien werd in de meeste studies slechts een zeer beperkt aantal isolaten getest (Hannan *et al.*, 1989; Ter Laak *et al.*, 1991; Tanner *et al.*, 1993; Friis en Szancer, 1994; Hannan *et al.*, 1997a; Hannan *et al.*, 1997b). Dit is vooral toe te schrijven aan het feit dat de kiem zeer traag groeit en zeer moeilijk te isoleren is, waardoor het niet eenvoudig is om een groot aantal isolaten te bekomen. Verder wordt het bepalen van de gevoeligheid bemoeilijkt door het feit dat er, in tegenstelling tot veel andere pathogene bacteriën,

geen gestandaardiseerde procedure beschikbaar is. Recentelijk werden door het International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology (IR-PCM) (Hannan, 2000) richtlijnen en aanbevelingen gepubliceerd voor MIC-bepalingen van *Mycoplasma* spp die van belang zijn in de diergeneeskunde.

De doelstelling van dit onderzoek was om op basis van deze richtlijnen de gevoeligheid van 21 *M. hyopneumoniae*-veldisolaten, die verzameld werden tussen 2000 en 2002, te onderzoeken voor 12 antimicrobiële middelen die in de Belgische varkenshouderij frequent worden gebruikt. Tevens werd het gebruik van antimicrobiële middelen op de bedrijven waar de isolaten werden bekomen, geregistreerd, om zodoende een eventueel verband te kunnen onderzoeken tussen het gebruik van antimicrobiële middelen en de resultaten van de gevoeligheidsbepalingen.

MATERIAAL EN METHODEN

M. hyopneumoniae-isolaten

Er werd gebruik gemaakt van 21 *M. hyopneumoniae*-stammen die geïsoleerd werden tussen 2000 en 2002 uit de longen van varkens van 21 verschillende gesloten Belgische varkensbedrijven (Vicca *et al.*, 2002; Vicca *et al.*, 2003). Alle isolaten waren afkomstig van slachtvarkens behalve de isolaten 1, 4, 5 en 6. Deze werden geïsoleerd bij biggen van 9-12 weken oud, zonder klinische ademhalingsproblemen. De antimicrobiële middelen die in de verschillende bedrijven gebruikt werden bij de zuigende biggen (0-4 weken oud), de gespeende biggen (4-10 weken oud) en bij varkens uit de voormest- en afmestafdeling (vanaf 10 weken tot wanneer ze geslacht worden), tijdens het

Tabel 1. De antimicrobiële middelen die op de bedrijven gebruikt werden in het jaar voorafgaand aan het onderzoek.

Bedrijf	Isolaat	Antimicrobiële middelen ^b gebruikt bij de		
		zuigende biggen	gespeende biggen	vleesvarkens
A	1	ENRO ^{1, a}	ENRO ¹	OXY ¹
B	2	DANO ¹	COL ⁵	none
C	3*	ENRO ¹	COL ⁵	TYL ⁴ of PEN ¹
D	4	AMK ²	AMK+COL ⁵	OXY ³ of DOX ³
E	5	AMK ² of PEN ²	TMP+SULF ³	TYL ³ of DOX ³
F	6	ENRO ¹	COL ⁴ , APR ⁴ , AMK ⁴ , OXY ⁴ , ENRO ¹	geen
G	7*	PEN ² , ENRO ¹ , NEO ¹	LIN ¹ , OXY ⁶ , TYL ⁶	LIN ¹ , OXY ⁶ , TYL ⁶
H	8	AMK ²	LIN ¹ , OXY ⁶	LIN ¹ , OXY ⁶
I	9	geen	COL ³	geen
J	10	geen	AMK ³	geen
K	11	geen	COL ⁵	geen
L	12	AMK ¹ , ENRO ¹ , PEN ²	AMK ¹ , APR ³ , COL ³ , DOX ⁴ , ENRO ¹ , TMP+SULF ³ ,	CEF ¹ , TYL ¹
M	13*	ENRO ¹ , PEN+STR ¹ , CEF ¹ , AMK ¹	AMK ⁵ , COL ⁵ , ENRO ² , CEF ¹ , PEN+STR ¹	OXY ⁵
N	14	geen	Geen	TMP+SULF ⁶
O	15	TMP+SULF ¹ , AMK ¹	OXY ¹	OXY ¹
P	16*	AMK ¹ , ENRO ¹	AMK ⁵ , AMK ¹	DOX ⁵ , FFN ¹
Q	17	CEF ¹ , ENRO ¹	COL ⁵ , TMP+SULF ⁴	geen
R	18**	geen	geen	LIN ¹
S	19*	ENRO ¹	ENRO ¹ , FLUM ³	ENRO ¹ , PEN ¹ , OXY ¹
T	20	geen	geen	DOX ⁴
U	21	COL ¹ , AMK ²	COL ⁵	TYL+DOX ⁵

^a: ¹: injecteerbaar (enkele varkens werden geïnjecteerd in geval van ziekte); ²: injecteerbaar (alle varkens geïnjecteerd, routinematig); ³: voedermedicatie (routinematig); ⁴: voedermedicatie (in geval van ziekte); ⁵: watermedicatie (routinematig); ⁶: watermedicatie (in geval van ziekte)

^b: AMK, amoxicilline; APR, apramycine; CEF, cefquinome; COL, colistine; DANO, danofloxacin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; FLUM, flumequine; LIN, lincomycine; OXY, oxytetracycline; PEN, penicilline; PEN+STR, penicilline en streptomycine; TMP+SULF, trimethoprim en sulfonamides; TYL, tylosine

*: Hoge MIC-waarden voor flumequine en enrofloxacin

** : Hoge MIC-waarden voor tylosine, tilmicosine en lincomycine

jaar voorafgaand aan het onderzoek, worden in Tabel 1 weergegeven. De *M. hyopneumoniae*-tipe-stam, ATCC 25634 (J-stam), werd als controlestam gebruikt. Alle isolaten werden bewaard bij -70°C .

Bepaling van de minimale inhibitorische concentratie (MIC)

De MIC-bepalingen werden uitgevoerd in 96-well microtiterplaten (Sensititre Ltd., Imberhome Lane, East Grinstead, Sussex, England). De volgende antimicrobiële middelen werden getest: lincomycine (0,06 - 8 $\mu\text{g/ml}$), lincomycine / spectinomycine 1:2 verhouding (0,06/0,12 - 8/16 $\mu\text{g/ml}$), spectinomycine (0,12 - 16 $\mu\text{g/ml}$), oxytetracycline (0,015 - 2 $\mu\text{g/ml}$), doxycycline (0,015 - 2 $\mu\text{g/ml}$), enrofloxacin (0,008 - 1 $\mu\text{g/ml}$), flumequine (0,12 - 16 $\mu\text{g/ml}$), gentamicine (0,12 - 16 $\mu\text{g/ml}$), florfenicol (0,12 - 16 $\mu\text{g/ml}$), tiamuline (0,015 - 1 $\mu\text{g/ml}$), tilmicosine (0,25 - 16 $\mu\text{g/ml}$) en tylosinetrataat (0,015 - 1 $\mu\text{g/ml}$). Iedere microtiterplaat bevatte ook drie cupjes zonder antimicrobiële middelen die gebruikt werden als positieve controles.

De *M. hyopneumoniae*-isolaten werden ontdooid bij kamertemperatuur en daarna geïncubeerd in friismedium gedurende 1-2 uur bij $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. De beko-men kiemsuspensies werden verdund in friismedium tot het aantal organismen 104 Color Changing Units (CCU)/ml bedroeg. Vijftig μl van de aldus verdunde cultuur werd overgebracht in ieder cupje van de microtiterplaat. De J-stam werd driemaal getest om de reproduceerbaarheid van de procedure te evalueren. Na inoculatie werden de microtiterplaten afgedekt met een adhesieve folie en gedurende 14 dagen bij $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ geïncubeerd. Ze werden dagelijks door dezelfde persoon beoordeeld. Er kon een groei van de *M. hyopneumoniae*-organismen waargenomen worden wanneer de kleur van het medium veranderde van rood naar geel (fenolrood als pH-indicator), overeenstemmend met een pH-daling van 7,4 naar 6,8 door glucosefermentatie. De initiële en finale MIC's werden genoteerd. De initiële MIC werd gedefinieerd als de laagste concentratie van het antimicrobiële middel waarbij er nog net geen kleurverandering optrad. De finale MIC werd gedefinieerd als de laagste concentratie van het antimicrobiële middel waarbij er 14 dagen na inoculatie geen kleurverandering was opgetreden (Tanner en Wu, 1992).

RESULTATEN

In Tabel 2 worden de initiële en finale MIC⁵⁰-, MIC⁹⁰- en MIC-intervallen weergegeven voor de 21 *M. hyopneumoniae*-veldisolaten. Enkel voor oxytetracycline, doxycycline en gentamicine verschilden de initiële en finale MIC⁵⁰ met meer dan één verdunning van elkaar. Er werden geen duidelijke verschillen vastgesteld tussen de initiële en finale MIC⁹⁰-waarden.

De MIC-waarden voor de 3 replicaten van de J-stam worden eveneens in Tabel 2 weergegeven. De waarden waren gelijk of verschilden voor slechts één verdunning van elkaar, wat duidt op een goede reproduceerbaarheid van de procedure. De initiële MIC-

waarden voor de J-stam waren in overeenstemming met de waarden die gerapporteerd werden in vroegere studies (Hannan *et al.*, 1989; Ter Laak *et al.*, 1991; Tanner *et al.*, 1993; Hannan *et al.*, 1997a,b).

In Tabel 3 worden de frequentiedistributies van de finale MIC-waarden weergegeven van de verschillende antimicrobiële middelen voor de 21 veldisolaten. De MIC's van oxytetracycline, doxycycline, tiamuline, spectinomycine, gentamicine, florfenicol en de lincomycine-spectinomycinecombinatie vertoonden een unimodale frequentiedistributie (Butaye *et al.*, 2003). Voor één isolaat, verkregen van bedrijf R, waren de MIC's van tylosine, tilmicosine en lincomycine duidelijk hoger dan voor de andere isolaten. Isolaten 3, 7, 13, 16 en 19 hadden een MIC-waarde $> 16 \mu\text{g/ml}$ voor flumequine terwijl de MIC⁵⁰ gelijk was aan 2 $\mu\text{g/ml}$. Voor dezelfde isolaten was de MIC-waarde van enrofloxacin $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ terwijl de MIC⁵⁰ 0,06 $\mu\text{g/ml}$ bedroeg.

DISCUSSIE

In dit onderzoek werd een bimodale frequentiedistributie van stammen over de geteste MIC-waarden vastgesteld voor de macroliden tylosine en tilmicosine, alsook voor het lincosamideantibioticum lincomycine. De MIC-waarden van deze antimicrobiële middelen waren duidelijk hoger voor één isolaat, wat op verworven antimicrobiële resistentie duidt. De MIC van tylosine was voor dit isolaat ook hoger dan het breekpunt dat door Hannan *et al.* (1997a) werd voorgesteld. Dit bevestigt dat dit isolaat verworven resistentie vertoonde tegen deze antibiotica. Macroliden en lincosamiden zijn chemisch wel verschillend van elkaar maar beide groepen antibiotica interfereren met de eiwitsynthese van bacteriën omdat ze binden op het 23S rRNA- van de 50S-subunit van de bacteriële ribosomen (Weisblum, 1995; Butaye, 2000). Een recent onderzoek heeft aangetoond dat een mutatie in de 23S rRNA-sequentie verantwoordelijk is voor de resistentie tegen macroliden en lincosamiden (Stakenborg *et al.*, 2005). Op het bedrijf waar de macrolide-lincosamide resistente *M. hyopneumoniae*-stam werd geïsoleerd, werden de vleesvarkens behandeld met lincomycine. Dit kan bijgedragen hebben tot de selectie van de hier vastgestelde antimicrobiële resistentie.

De MIC's van flumequine en enrofloxacin vertoonden eveneens een brede frequentiedistributie, neigend naar een bimodale verdeling. Voor 5 van de 21 isolaten was de MIC van flumequine $> 16 \mu\text{g/ml}$, wat hoger is dan het breekpunt van $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ voorgesteld door Hannan *et al.* (1997a). Voor deze isolaten was de MIC van enrofloxacin $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ terwijl de MIC⁵⁰ 0,06 $\mu\text{g/ml}$ was. Deze vrij hoge frequentie van verworven resistentie tegen fluoroquinolonen is verrassend. Alhoewel reeds fluoroquinolone resistente *M. hominis*-isolaten beschreven werden (Bébéar *et al.*, 1999), werd resistentie tegen deze antimicrobiële middelen zelden gerapporteerd bij *Mycoplasma* spp die bij de mens voorkomen. Door Hannan *et al.* (1997a) werd verworven resistentie tegen flumequine beschreven bij *Mycoplasma* spp van pluimvee, varkens

Tabel 2. Initiële en finale MIC⁵⁰, MIC⁹⁰ en MIC-interval (µg/ml) van antimicrobiële middelen voor Belgische *M. hyopneumoniae*-veldisolaten. De MIC voor de referentiestam (J-stam) werd driemaal bepaald en de resultaten worden eveneens in deze tabel gegeven.

Antimicrobieel middel ¹	Resultaat	Veldisolaten (n=21)			Referentiestam: J-stam
		MIC ⁵⁰	MIC ⁹⁰	MIC-Range	MIC-range
LIN	initieel	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06 - > 8	<0,06
	finale	≤ 0,06	0,12	≤ 0,06 - > 8	0,25
LIN/SPT	initieel	≤ 0,06/0,12	≤ 0,06/0,12	≤ 0,06/0,12 - 0,25/0,5	<0,06/0,12
	finale	≤ 0,06/0,12	0,12/0,25	≤ 0,06/0,12 - 0,25/0,5	0,12/0,25 - 0,25/0,5
SPT	initieel	0,25	0,5	≤ 0,12 - 0,5	0,5
	finale	0,5	1	≤ 0,12 - 1	1 - 2
OXY	initieel	0,12	1	0,03 - 2	0,12
	finale	0,5	2	0,12 - > 2	1
DOX	initieel	0,12	0,5	0,03 - 1	0,06 - 0,12
	finale	0,5	1	0,12 - 2	0,5 - 1
ENRO	initieel	0,03	0,5	0,015 - > 1	0,015 - 0,03
	finale	0,06	0,5	0,03 - > 1	0,06
FLUM	initieel	1	> 16	0,25 - > 16	0,5 - 1
	finale	2	> 16	0,5 - > 16	2
GEN	initieel	≤ 0,12	0,5	≤ 0,12 - 1	0,25 - 0,5
	finale	0,5	1	≤ 0,12 - 1	0,5 - 1
FFN	initieel	≤ 0,12	0,25	≤ 0,12 - 0,5	0,25
	finale	0,25	0,5	≤ 0,12 - 1	1
TIA	initieel	≤ 0,015	0,12	≤ 0,015 - 0,12	0,03
	finale	0,03	0,12	≤ 0,015 - 0,12	0,06
TIL	initieel	0,25	0,5	≤ 0,25 - > 16	0,25
	finale	0,5	0,5	≤ 0,25 - > 16	0,5
TYL	initieel	0,03	0,06	≤ 0,015 - > 1	<0,015 - 0,03
	finale	0,06	0,12	≤ 0,015 - > 1	0,12

1: LIN, lincomycine; SPT, spectinomycine; OXY, oxytetracycline; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FLUM, flumequine; GEN, gentamicine; FFN, florfenicol; TIA, tiamuline; TIL, tilmicosine; TYL, tylosine

Tabel 3. Frequentiedistributie van de finale minimale inhibitorische concentraties (MIC's) van 12 antimicrobiële middelen voor 21 Belgische *M. hyopneumoniae*-veldisolaten.

Antimicrobieel middel ¹	Aantal stammet met MIC (µg/ml) of										
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Lincomycine			16	4	3					1** (>)*	
Lincomycine/ Spectinomycine			17	4	3						
Spectinomycine				3 (≤)	2	8	11				
Oxytetracycline				5	2	5	5	6, 1 (>)			
Doxycycline				5	3	5	9	2			
Enrofloxacin		5	13		1	4	1 (>)				
Flumequine						3	3	11	2		5 (>)
Gentamicine				4 (≤)	4	10	6				
Florfenicol				7 (≤)	8	6	3				
Tiamuline	4	10	7	3							
Tilmicosine					10 (≤)	13					1 (>)
Tylosine	2	5	6	10			1 (>)				

*: > : hoger dan de aangegeven MIC

≤: gelijk aan of lager dan de aangegeven MIC

** : isolaten met verworven resistentie zijn onderlijnd

(verschillend van *M. hyopneumoniae*), rundvee, schapen en geiten. Thomas *et al.* (2003) isoleerden enrofloxacineresistente stammen bij rundvee. Er werd ook aangetoond dat het uitvoeren van *in vitro* passages van mycoplasma's in aanwezigheid van enrofloxacin kan resulteren in het uitslecteren van fluoroquinoloneresistente mutanten (Gautier-Bouchardon *et al.*, 2002; Reinhardt *et al.*, 2002; Bébéar *et al.*, 1997). Een mogelijke verklaring voor de hoge prevalentie van fluoroquinoloneresistentie in dit onderzoek ligt in het frequent gebruik van enrofloxacin om *E. coli*-infecties bij pasgeboren en gespeende biggen te bestrijden. In alle bedrijven waar een *M. hyopneumoniae*-isolaat werd bekomen dat verworven resistentie vertoonde tegen fluorquinolonen, werden deze antimicrobiële middelen gebruikt bij de zuigende biggen. Daarentegen werden in slechts 5 bedrijven waar een *M. hyopneumoniae*-isolaat werd bekomen zonder verworven resistentie, fluoroquinolonen sporadisch gebruikt om zuigende biggen te behandelen. Voor één isolaat was de MIC van enrofloxacin zelfs $>1\mu\text{g/ml}$. Op dat bedrijf werden fluoroquinolonen zowel gebruikt bij biggen in de kraamstal als bij gespeende biggen en bij vleesvarkens. Het moleculaire mechanisme achter deze fluoroquinoloneresistentie werd ondertussen ook opgeklaard en berust op puntmutaties in de DNA-gyrase-eenheid *gyrA* en de topoisomerase eenheid *parC*. Deze DNA-stukjes bevatten de "quinolone resistance determining regions (QRDR)". Eerst treedt er een puntmutatie op in *parC*, wat resulteert in een beperkte resistentie tegen enrofloxacin (MIC = 0,5). Vervolgens treedt er een puntmutatie op in *gyrA*, leidend tot een toenemende enrofloxacineresistentie (MIC > 1) (Vicca *et al.*, 2007).

De MIC's van oxytetracycline en doxycycline vertoonden geen bimodale verdeling en de MIC's van oxytetracycline waren lager dan het breekpunt voorgesteld door Hannan *et al.* (1997a). Dit duidt op de afwezigheid van verworven resistentie tegen deze antimicrobiële middelen hoewel op 62% van de geselecteerde bedrijven tetracyclinen gebruikt werden in de biggenbatterij en vleesvarkensafdelingen. *M. hyopneumoniae*-isolaten met verminderde gevoeligheid voor oxytetracycline werden gerapporteerd in Japan (Inamoto *et al.*, 1994). Verworven resistentie tegen chloortetracycline werd beschreven door Yamamoto en Koshimizu (1984), Inamoto *et al.* (1994) en Etheridge *et al.* (1979). Om het voorkomen van verworven resistentie tegen tetracyclinen na te gaan, werd in ons onderzoek gebruik gemaakt van oxytetracycline en doxycycline omdat chloortetracycline weinig stabiel is (Ray en Newton, 1991) en de activiteit gedurende de lange incubatieperiode die noodzakelijk is om *M. hyopneumoniae* te laten groeien, dus onvoldoende gegarandeerd is.

Als conclusie kan gesteld worden dat dit de eerste studie is waarbij verworven resistentie bij *M. hyopneumoniae*-veldisolaten werd vastgesteld tegen macroliden, lincosamiden en fluoroquinolonen. Resistentie tegen andere antimicrobiële middelen werd niet gevonden. De vrij hoge frequentie van fluoroquinoloneresistentie is opvallend en dient dierenartsen aan te sporen tot een verantwoord gebruik van deze middelen in de varkenshouderij.

DANKBETUIGING

Het onderzoek werd uitgevoerd in het kader van het onderzoeksproject S-6039 gefinancierd door de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu, Brussel, België. De varkenshouders worden bedankt voor de medewerking aan dit onderzoek.

REFERENTIES

- Bébéar C.M., Bové J. M., Bébéar C., Renaudin J. (1997). Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 269-273.
- Bébéar C.M., Renaudin J., Charron A., Renaudin H., De Barbeyrac B., Schaefferbeke T., Bébéar C. (1999). Mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 954-956.
- Butaye P. (2000). Antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains from animals and animal-derived foods. Ph.D. thesis. Ghent University, Belgium.
- Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 175-188.
- Etheridge J.R., Lloyd L.C., Cottew G.S. (1979). Resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to chlortetracycline. *Australian Veterinary Journal* 55, 40.
- Friis N.F., Szancer J. (1994). Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35, 389-394.
- Gautier-Bouchardon A.V., Reinhardt A.K., Kobisch M., Kempf I. (2002). In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology* 88, 47-58.
- Hannan P.C.T. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Veterinary Research* 31, 373-395.
- Hannan P.C.T., O'Hanlon P.J., Rogers N.H. (1989). In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Research in Veterinary Science* 46, 202-211.
- Hannan P.C.T., Windsor H.M., de Jong A., Schmeer N., Stegemann M. (1997a). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2037-2040.
- Hannan P.C.T., Windsor H.M., Ripley P.H. (1997b). In vitro susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor), tiamulin and enrofloxacin and the in vitro development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Research in Veterinary Science* 36, 157-160.

- Inamoto T., Takahashi K., Yamamoto K., Nakai Y., Ogimoto K. (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *The Journal of Veterinary Medical Science* 56, 393-394.
- Ray A., Newton V. (1991). Use of high-performance liquid chromatography to monitor stability of tetracycline and chlortetracycline in susceptibility determinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1264-1266.
- Reinhardt A.K., Bébéar C.M., Kobisch M., Kempf I., Gautier-Bouchardon A.V. (2002). Characterization of mutations in DNA Gyrase and Topoisomerase IV involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 590-593.
- Stakenborg T., Vicca J., Butaye P., Maes D., Minion F.C., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck F. (2005). Characterization of in vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microbial Drug Resistance* 11, 290-294.
- Tanner A.C., Wu C.C. (1992). Adaptation of the Sensititre® broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases* 36, 714-717.
- Tanner A.C., Erickson B.Z., Ross R.F. (1993). Adaptation of the Sensititre® broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 36, 301-306.
- Ter Laak E.A., Pijpers A., Noordergraaf J.H., Schroevens E.C., Verheijden J.H.M. (1991). Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine mycoplasma species to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 228-233.
- Thomas A., Nicolas C., Dizier I., Mainil J., Linden A. (2003). Antibiotic susceptibilities of recent Belgian *Mycoplasma bovis* isolates. *The Veterinary Record* 153, 428-431.
- Vicca J., Maes D., Thermote L., Peeters J., Haesebrouck F., de Kruif A. (2002). Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 49, 349-353.
- Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology* 97, 177-190.
- Vicca J., Maes D., Stakenborg T., Butaye P., Minion C., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck, F. (2007). Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microbial Drug Resistance* 13, in press.
- Weisblum B. (1995). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 797-805.
- Yamamoto K., Koshimizu K. (1984). *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics, p. 116. *Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society Congress*, Ghent, Belgium.