

# UTILIZZO DELLA LINCOMICINA NELLA TERAPIA DELLE MASTITI BOVINE: VALUTAZIONE DEI TEST DI RESISTENZA ANTIMICROBICA IN VITRO

Antonio Barberio – Giulia Rosa – Sondra Bonamico  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Struttura Complessa Territoriale di Verona e Vicenza  
Sezione di Vicenza

## 1)INTRODUZIONE

La lincomicina appartiene al gruppo dei lincosamidi, antibiotici che comprendono oltre alla lincomicina, la clindamicina e la pirlimicina. Il meccanismo d'azione dei lincosamidi è simile a quello dei macrolidi, ovvero inibizione della sintesi di proteine batteriche per fissazione sulle sub-unità 50S del ribosoma. L'azione antibatterica è di tipo batteriostatico, ed è presente l'effetto postantibiotico, analogamente a quanto avviene nei macrolidi. Lo spettro d'azione comprende cocchi Gram+ (stafilococchi e streptococchi), alcuni bacilli Gram+, fra cui *B. cereus*, anaerobi Gram+ e Gram-.

La valutazione della sensibilità agli antimicrobici per quest'antibiotico è solitamente ottenuta per via indiretta testando come molecola marker la clindamicina. La linea guida (1) prodotta dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) per i batteri isolati in campo veterinario riporta infatti solo i breakpoints di valutazione per la clindamicina sia per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) che per il test di diffusione in agar (KB). I breakpoints riportati inoltre sono relativi alle infezioni della cute e dei tessuti molli del cane. In letteratura i breakpoints specifici per la lincomicina (2) sono riportati solo nelle linee guida della Società Francese di Microbiologia, Comitato Antibiogrammi (CASFM), limitatamente agli streptococchi. Pertanto è necessario verificare il grado di affidabilità dei breakpoints stabiliti dalla CASFM e CLSI per il test di diffusione in agar, al fine di valutare la loro applicabilità nella routine di laboratorio

Obiettivo del presente lavoro è valutare la correlazione per i test di sensibilità agli antibiotici nei confronti della lincomicina fra i risultati ottenuti con il test di diffusione in agar rispetto al test della MIC

## 2)MATERIALI E METODI

### 2.1.Ceppi batterici

Sono stati individuati in una prima fase 246 ceppi batterici di Gram+ ottenuti da casi di mastite rilevati nelle provincie di Padova, Vicenza, Treviso, Trento e Bolzano, provenienti da 133 aziende diverse. I ceppi selezionati sono stati sottoposti ad antibiogramma con il test KB impiegando un dischetto di lincomicina da 10 µg. In base al risultato del test i ceppi sono stati suddivisi in sensibili, intermedi e resistenti. Fra questi ceppi sono stati poi selezionati 98 ceppi di specie batteriche diverse in modo che per ogni specie batterica fosse presente un solo ceppo per azienda, al fine di ottenere la maggior variabilità possibile fra i diversi ceppi da testare. Oltre che con il predetto criterio, i ceppi sono stati scelti in modo proporzionato rispetto all'esito del test KB per la lincomicina, per cui sono stati selezionati 34 ceppi sensibili, 38 resistenti e 26 intermedi. I 98 ceppi batterici sono stati poi saggiati per la sensibilità alla lincomicina sia con il metodo della MIC che con quello di KB.

### 2.2.Metodi analitici

#### Esame colturale del latte

Tutti i ceppi batterici impiegati sono stati reisolati in agar sangue + esculina e sottoposti alla procedura d'identificazione prevista dalle linee guida del National Mastitis Council per l'esame colturale dei campioni di latte per diagnosi di mastite. In aggiunta tutti i ceppi microbici sono stati

sottoposti a test biochimici in micro metodo (API system, Biomerieux, Lyon) per la corretta identificazione di specie. Solo per l'identificazione di specie dei ceppi di *Streptococcus uberis* non sono stati usati test biochimici in micrometodo in quanto non efficaci per l'identificazione di specie, mentre oltre alle classiche prove su terreni colturali selettivi e differenziali, è stata valutata l'assenza di agglutinazione ai principali antigeni di Lancefield.

### Test di sensibilità agli antibiotici mediante determinazione della MIC

L'antibiogramma veniva eseguito usando il metodo della minima concentrazione inibente per diluizione in brodo in micrometodo secondo le modalità descritte nella linea guida del C.L.S.I. (1). Per il test sono state usate delle piastre già preparate con le opportune diluizioni di antibiotico disponibili in commercio (Sensititre Gram Positive Narms Plate Format, Trek Diagnostics System, East Grinstead, UK). Da ogni piastra di agar sangue venivano prelevate 3-5 colonie, emulsionate in 4 ml di acqua distillate sterili. Poi 10 µL della sospensione ottenuta venivano miscelati con 11 mL di Mueller-Hinton broth addizionato di cationi (Aris Cation Adjusted MH TES Broth, Trek Diagnostics System, East Grinstead, UK), per ottenere un "inoculum" di  $1 \times 10^5$  cfu/mL. 50 µL di questo venivano poi distribuiti in ogni pozzetto della piastra Sentitre, che era posta in incubatore termostato a  $37^\circ \pm 1$  C per 18-24 ore. La lettura delle piastre Sensititre era effettuata manualmente registrando l'ultima concentrazione di antibiotico nella quale non era presente intorbidimento o deposito di cellule. Le diluizioni di lincomicina impiegate erano le seguenti: 1-2-4-8 µg. I breakpoints utilizzati per la valutazione delle resistenze (tabella 1) sono stati sia quelli indicati nella guida CLSI (1) che quelli delle linee guida CASFM (2).

### Test di sensibilità agli antibiotici mediante test di diffusione in agar (KB)

L'antibiogramma era effettuato usando il test di diffusione in agar secondo le modalità previste nella linea guida del C.L.S.I. (1), applicando due modifiche, relative ai dischetti di antibiotico, ed ai breakpoints degli aloni di inibizione impiegati. La suscettibilità dei microrganismi alla lincomicina era testata impiegando due diversi tipi di dischetti, imbevuti rispettivamente di 10 e di 15 µg di lincomicina. Per quanto riguarda i breakpoints degli aloni di inibizione impiegati per valutare la sensibilità o la resistenza dei ceppi, oltre ai valori previsti da C.L.S.I. sono stati valutati anche gli aloni proposti dalle linee guida CASFM (tabella 1).

Tabella 1: MIC e KB breakpoints per la valutazione della suscettibilità dei batteri aerobi alla lincomicina previsti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dalla Società Francese di microbiologia, comitato antibiogrammi (CASFM).

	Antibiotico	MIC breakpoint			Diametro inibizione disco			antibiotico dischetto
		S	I	R	S	I	R	
CLSI	Clindamicina	≤ 0,5	1 - 2	≥ 4	≥ 21	20 - 15	≤ 14	2 µg
CASFM	Lincomicina	≤ 2	4	≥ 8	≥ 21	20 - 17	< 17	15 µg

### 2.3. Analisi statistica dei dati

I risultati delle analisi effettuati sono stati comparati fra loro al fine di valutare la correlazione del test di diffusione in agar con la MIC. Per ogni confronto è stata calcolata la sensibilità, intesa come la proporzione di ceppi sensibili alla lincomicina individuati dal test, la specificità, intesa come la proporzione di ceppi intermedi o resistenti alla lincomicina individuati dal test, e il grado di concordanza fra i due test confrontati, espresso con il k di Cohen. I livelli di concordanza espressi con il k di Cohen sono valutati usualmente con la seguente scala:

- se k assume valori compresi tra 0-0,4, la concordanza è scarsa;

- se k assume valori compresi tra 0,4-0,6, allora la concordanza è accettabile;
- se k assume valori compresi tra 0,6-0,8, la concordanza è buona;
- se k assume valori compresi tra 0,8-1, la concordanza è ottima.

I confronti fra test effettuati sono stati seguenti:

1. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CASFM e il metodo KB con dischetto da 15 µg e breakpoints CASFM;
2. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 15 µg e breakpoints CASFM;
3. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CLSI
4. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CASFM e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CASFM;
5. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CASFM;
6. Confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CLSI.

### 3) RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 1 sono elencati i risultati dei test di sensibilità agli antibiotici impiegati. I breakpoints più restrittivi previsti dal CLSI riducono di quasi il 20% il numero dei ceppi catalogati come sensibili usando i valori di MIC previsti dal CASFM. A questo proposito va ovviamente considerato che i valori di MIC indicati da CLSI sono previsti per la clindamicina e non in modo specifico per la lincomicina, pur essendo a questa estensibili. Inoltre i valori di MIC indicati sono stati testati prevalentemente su ceppi di *Staphylococcus* spp isolati dalla cute del cane. I valori di interpretazione previsti da CASFM sono invece stati validati solo per gli streptococchi. Un aspetto che evidenzia bene la differenza dei ceppi usati per la costruzione dei breakpoints è il numero di ceppi con valori di resistenza intermedia, che, se si utilizzano i dati CASFM, è molto contenuto per quanto riguarda gli streptococchi e più alto per gli stafilococchi, mentre se si utilizzano i dati CLSI si ha un risultato esattamente speculare. Per quanto riguarda i dati ottenuti con il metodo KB si evidenzia come l'impiego del dischetto con 15 µg di lincomicina dia una percentuale di ceppi classificati come intermedi molto più contenuta rispetto al dischetto da 10. Per quanto riguarda la tipologia dei ceppi non vi sono state particolari differenze poiché il numero di ceppi intermedi è risultato più alto con il dischetto da 10 µg per tutte le diverse specie batteriche testate. Inoltre, come era prevedibile, l'impiego di un dischetto con una concentrazione più alta di antibiotico aumenta sensibilmente il numero di ceppi classificati come positivi.

Tabella 2: risultati dei diversi test di sensibilità agli antibiotici effettuati sui 98 ceppi testati per la lincomicina

Ceppo batterico	N° ceppi	<sup>1</sup> MIC CASFM			<sup>2</sup> MIC CLSI			KB 15 microgr			KB 10 microgr		
		<sup>3</sup> S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<b>Staphylococcus coag -</b>	22	9	9	4	6	3	13	16	1	5	8	8	6
<b>S. aureus</b>	12	9	1	2	9	0	3	9	2	1	6	3	3
<b>Enterococchi</b>	22	5	1	16	4	1	17	7	3	12	4	4	14
<b>Altri Streptococchi</b>	42	23	5	14	12	11	19	18	6	18	16	11	15
<b>Totale</b>	98	46	16	36	31	15	52	50	12	36	34	26	38
<b>Totale %</b>	-	<b>47%</b>	<b>16%</b>	<b>37%</b>	<b>32%</b>	<b>15%</b>	<b>53%</b>	<b>51%</b>	<b>12%</b>	<b>37%</b>	<b>35%</b>	<b>27%</b>	<b>39%</b>

<sup>1</sup>MIC CASFM: dati MIC con i break-point indicati dalla Società francese di microbiologia.

<sup>2</sup>MIC CLSI: dati MIC con i break-point indicati dal Clinical and Laboratory standard Institute per i batteri isolati dagli animal.

<sup>3</sup>S = sensibile - I = intermedio - R = resistente

Sono stati poi eseguiti i confronti per valutare la concordanza fra i risultati della MIC e quelli del KB. Assumendo come valore di riferimento quello ottenuto con la MIC impiegando i breakpoints previsti da CASFM, il KB, effettuato usando i dischetti da 15 µg e i breakpoints previsti da CASFM, evidenziava una sensibilità pari a 0,74 una specificità pari 0,69, e un grado di correlazione accettabile perché pari a 0,42 (tabella 3).

Tabella 3: tabella di contingenza del confronto fra risultati MIC con i breakpoints CASFM e il metodo KB con dischetto da 15 µg e breakpoints CASFM. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CASFM

Tavola di contingenza S KB 15 microg (1) * ESITO MIC CASFM (1)					
			ESITO MIC CASFM (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
S KB 15 microg (1)	Resistenti	Conteggio	36	12	48
		%entro ESITO MIC CASFM (1)	69,2%	26,1%	49,0%
	Sensibili	Conteggio	16	34	50
		%entro ESITO MIC CASFM (1)	30,8%	73,9%	51,0%
Totale		Conteggio	52	46	98

Un aspetto da considerare è l'elevato numero di ceppi batterici, 16 su 98, risultati sensibili al metodo KB mentre con la MIC erano classificati come resistenti. Ovviamente questa tipologia di errore è estremamente critica, poiché può determinare un grave errore di valutazione nella scelta della terapia.

Se si valuta la concordanza fra i risultati della MIC e quelli del KB, assumendo come valore di riferimento quello ottenuto con la MIC impiegando i breakpoints previsti da CLSI, il KB effettuato usando i dischetti da 15 µg evidenziava una sensibilità pari a 0,90 una specificità pari 0,67, e un grado di correlazione accettabile perché pari a 0,49 (tabella 4).

Tabella 4: tabella di contingenza del confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 15 µg e breakpoints CASFM. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CLSI

Tavola di contingenza S KB 15 microg (1) * Esito MIC CLSI (1)					
			Esito MIC CLSI (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
S KB 15 microg (1)	Resistenti	Conteggio	45	3	48
		%entro Esito MIC CLSI (1)	67,2%	9,7%	49,0%
	Sensibili	Conteggio	22	28	50
		%entro Esito MIC CLSI (1)	32,8%	90,3%	51,0%
Totale		Conteggio	67	31	98

In questo caso, nonostante il miglioramento notevole della sensibilità e l'incremento della concordanza, i risultati sono peggiorativi poiché si ha una ulteriore riduzione della specificità e i ceppi dati erroneamente come sensibili dal metodo KB aumentano da 16 a 22, visto che i breakpoints previsti da CLSI sono più restrittivi rispetto a quelli CASFM.

Confrontando i risultati ottenuti con il metodo KB impiegando il dischetto da 10 µg e i breakpoints CASFM, e prendendo come valore di riferimento quello ottenuto con la MIC impiegando i breakpoints previsti da CASFM, si evidenziava una sensibilità pari a 0,63 una specificità pari 0,90, e un grado di correlazione pari a 0,54 (tabella 5). Il risultato ottenuto impiegando il dischetto 10 µg

ha messo in luce una riduzione della sensibilità; in pratica il numero di ceppi classificati erroneamente come resistenti dal KB è aumentato rispetto all'uso di un dischetto da 15 µg. D'altro canto con il dischetto da 10 µg si è avuto un considerevole miglioramento della specificità, per cui i ceppi resistenti alla lincomicina, classificati dal KB come sensibili, sono passati da 16 a 5, riducendo i possibili errori terapeutici in modo apprezzabile.

*Tabella 5: tabella di contingenza del confronto fra fra risultati MIC con i breakpoints CASFM e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CASFM. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CASFM*

Tavola di contingenza S KB 10 microg (1) * ESITO MIC CASFM (1)					
			ESITO MIC CASFM (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
S KB 10 microg (1)	Resistenti	Conteggio	47	17	64
		%entro ESITO MIC CASFM (1)	90,4%	37,0%	65,3%
	Sensibili	Conteggio	5	29	34
		%entro ESITO MIC CASFM (1)	9,6%	63,0%	34,7%
Totale		Conteggio	52	46	98

Se si considerano poi i risultati ottenuti dal confronto MIC vs KB con dischetto da 10 µg, impiegando per la MIC i più restrittivi breakpoints previsti da CLSI, si evidenzia un miglioramento della sensibilità che passa da pari a 0,63 a 0,77 e una modica variazione della specificità che da 0,90 passa a 0,85 (tabella 6). Il grado di correlazione fra i due test è stato pari 0,60, che nella scala di valutazione del k di Cohen viene valutato come buono. Unico punto critico in questo caso l'incremento dei ceppi classificati come sensibili dal KB e risultati resistenti alla MIC, che passano da 5 a 10.

*Tabella 6: tabella di contingenza del confronto fra fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CASFM. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CLSI*

Tavola di contingenza S KB 10 microg (1) * Esito MIC CLSI (1)					
			Esito MIC CLSI (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
S KB 10 microg (1)	Resistenti	Conteggio	57	7	64
		%entro Esito MIC CLSI (1)	85,1%	22,6%	65,3%
	sensibili	Conteggio	10	24	34
		%entro Esito MIC CLSI (1)	14,9%	77,4%	34,7%
Totale		Conteggio	67	31	98

Infine è stato eseguito il confronto fra il metodo della MIC e quello KB impiegando come riferimento i breakpoints CLSI sia per la MIC che per il KB. Confrontando i risultati ottenuti con il metodo KB impiegando il dischetto da 15 µg, e prendendo come valore di riferimento quello ottenuto con la MIC impiegando i breakpoints CLSI, si evidenziava una sensibilità pari a 0,90 una specificità pari 0,67, e un grado di correlazione pari a 0,49 (tabella 7), esattamente uguali a quelli ottenuti usando come riferimento per il KB i breakpoints CASFM. Analogo risultato è stato ottenuto confrontando i dati ottenuti con il metodo KB impiegando il dischetto da 10 µg, e prendendo come valore di riferimento quello ottenuto con la MIC impiegando i breakpoints CLSI

(tabella 8). Sensibilità, specificità e grado di correlazione sono risultati identici a quelli ottenuti usando come riferimento per il KB i breakpoints CASFM.

*Tabella 7: tabella di contingenza del confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 15 µg e breakpoints CLSI. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CLSI*

Tavola di contingenza KB 15 microg CLSI (1) * Esito MIC CLSI (1)					
			Esito MIC CLSI (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
KB 15 microg CLSI (1)	Resistenti	Conteggio	45	3	48
		% entro Esito MIC CLSI (1)	67,2%	9,7%	49,0%
	Sensibili	Conteggio	22	28	50
		% entro Esito MIC CLSI (1)	32,8%	90,3%	51,0%
Totale		Conteggio	67	31	98

*Tabella 8: tabella di contingenza del confronto fra risultati MIC con i breakpoints CLSI e il metodo KB con dischetto da 10 µg e breakpoints CLSI. I risultati sono espressi in valore assoluto ed in percentuale di dati concordanti e discordanti usando come riferimento standard i valori ottenuti con il metodo MIC CLSI*

Tavola di contingenza KB 10 microg CLSI (1) * Esito MIC CLSI (1)					
			Esito MIC CLSI (1)		Totale
			Resistenti	sensibili	
KB 10 microg CLSI (1)	Resistenti	Conteggio	57	7	64
		% entro Esito MIC CLSI (1)	85,1%	22,6%	65,3%
	Sensibili	Conteggio	10	24	34
		% entro Esito MIC CLSI (1)	14,9%	77,4%	34,7%
Totale		Conteggio	67	31	98

*Tabella 9: valori di sensibilità, specificità e grado di correlazione misurato con K di Cohen, rilevati nei confronti fra MIC e metodo KB usando due diversi dischetti ( 10 e 15 µg) e i breakpoints previsti rispettivamente da CASFM e CLSI.*

Confronto	Sensibilità	Specificità	Correlazione (K)
MIC CASFM vs KB CASFM 15 µg	0,74	0,69	0,42
MIC CLSI vs KB CASFM 15 µg	0,90	0,67	0,49
MIC CLSI vs KB CLSI 15 µg	0,90	0,67	0,49
MIC CASFM vs KB CASFM 10 µg	0,63	0,90	0,54
MIC CLSI vs KB CASFM 10 µg	0,77	0,85	0,60
MIC CLSI vs KB CLSI 10 µg	0,77	0,85	0,60

#### 4)CONCLUSIONI

I risultati della prova effettuata hanno messo in evidenza che il grado di correlazione fra il metodo di riferimento della MIC e il KB rientra in un livello che può essere definito solo accettabile. Infatti, solo in uno dei diversi confronti effettuati si è avuto un valore classificabile come buono, mentre tutti gli altri confronti hanno dato valori di k compresi fra 0,42 e 0,54. Il dato riscontrato per la

lincomicina è assimilabile a quanto emerso per altri farmaci, e mette in luce la necessità per i laboratori diagnostici di implementare l'uso del metodo MIC per migliorare la qualità del dato analitico.

Per quanto riguarda i criteri d'interpretazione del metodo KB non vi sono state differenze significative applicando gli aloni previsti da CAFSM rispetto a quelli previsti da CLSI, per cui, considerando che i breakpoints CASFM sono stati validati usando specificamente la lincomicina, mentre quelli CLSI sono stati testati per la clindamicina, si ritiene opportuno consigliare l'impiego dei breakpoints CASFM nell'applicazione del metodo KB.

## **5)BIBLIOGRAFIA**

- 1)CLSI VET01-A4 and VET01-S2 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals; Approved Standard-Fourth Edition and Supplement, VET01A4E and VET01S2E.
- 2) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2000–2001, Path Biol 2000;48:832–871.