

Studio delle resistenze agli antibatterici attraverso la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

VANTAGGI PRATICI PER IL VETERINARIO NELLA SCELTA RAZIONALE DEL FARMACO

Luca Bano

Laboratorio di Batteriologia Speciale

Sezione Diagnostica di Treviso

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

COSA SI INTENDE PER RESISTENZA AD UN ANTIBIOTICO (FARMACORESISTENZA)

1. La capacità di determinate specie batteriche di resistere all'azione di sostanze che possono causarne la morte (battericidi) o arrestarne l'accrescimento (batteriostatici)

2. La resistenza può essere: **innata** o **acquisita**
 - a. innata quando dipende dalla struttura del microrganismo rispetto al meccanismo d'azione del farmaco

 - b. acquisita quando il microrganismo possiede dei **GENI DI RESISTENZA** che codificano dei meccanismi di difesa dall'azione del farmaco

PERCHÉ STUDIARE LA FARMACONSENSIBILITÀ DI UN MICRORGANISMO? (1)

Aspetti pratici

1. **CURARE EFFICACEMENTE** un animale malato
2. **EVITARE PERDITE ECONOMICHE** dovute a terapie errate o derivanti dal rispetto dei tempi di sospensione

Aspetti «etici»

3. evitare l'insorgenza di popolazioni microbiche **FARMACORESISTENTI**
4. preservare l'efficacia dei **CRITICALLY IMPORTANT ANTIMICROBIALS** (CIA): es. cefalosporine a spettro esteso (3^a e 4^a generazione), fluorochinolonici

PERCHÉ STUDIARE LA FARMACOSENSIBILITÀ DI UN MICRORGANISMO? (2)

Conclusioni del Consiglio del 22 giugno 2012 sull'impatto della resistenza antimicrobica nel settore della salute umana e nel settore veterinario — una prospettiva di tipo «One Health»

(2012/C 211/02)

- b. Importanza della diagnosi e dei test di farmacosensibilità
- e. Limitare l'impiego dei CIA solo dopo che test di laboratorio abbiano decretato l'inefficacia degli altri antimicrobici
- g. Trattare solo gli animali malati o altri animali solo in base a fondate ragioni epidemiologiche
- h. Migliorare le condizioni ambientali di allevamento e implementare quelle profilattiche

PRE-REQUISITO PER L'ESECUZIONE DEI TEST DI FARMACOSENSIBILITÀ: DIAGNOSI BATTERIOLOGICA

Quali microrganismi sottoporre a test di farmacosenibilità?

1. Batteri riconosciuti come **PATOGENI** per l'apparato e la specie animale da cui è stato condotto l'esame batteriologico
2. Batteri non noti come «patogeni», ma isolati da **ORGANI O TESSUTI FISIOLGICAMENTE STERILI**
3. Specie batterica normalmente presente nel distretto d'isolamento, ma che potrebbe avere dei **FATTORI DI VIRULENZA** tali da rivestire un ruolo eziologico

METODI PER TESTARE LE FARMACORESISTENZE

A. METODI GENOTIPICI

Ricercano direttamente i geni di resistenza

➤ PCR

➤ MICROARRAY

B. METODI «FENOTIPICI»

prevedono il contatto diretto tra il farmaco e il microrganismo in esame

➤ Metodo KIRBY-BAUER (Antibiogramma)

➤ Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

➤ Metodo a gradiente predefinito (E-TEST)

➤ Tecnologia MALDI TOF MS (si basa sulla spettrometria di massa)

Metodo Kirby Bauer (antibiogramma)

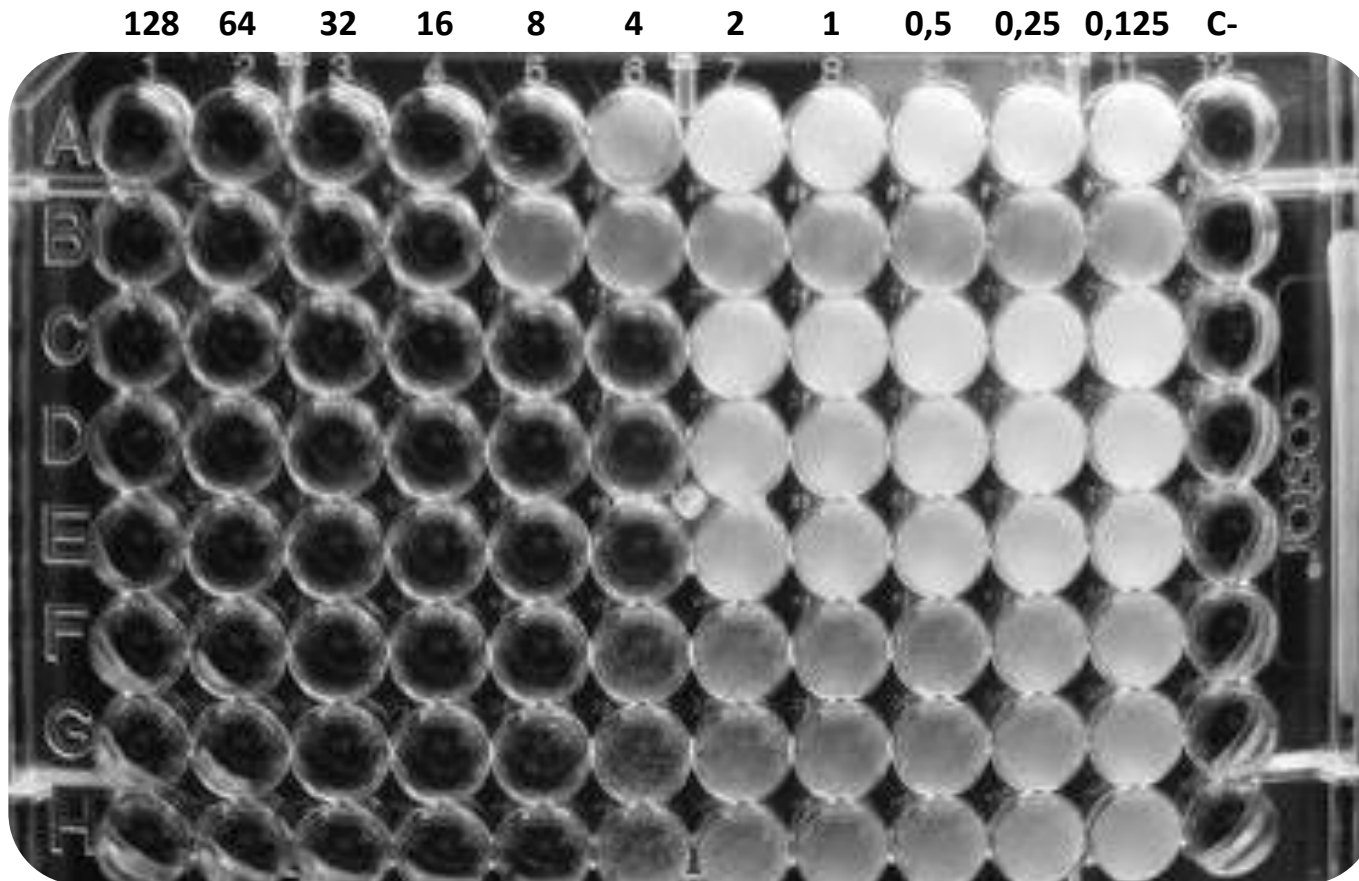


Table 2A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter (mm)			MIC Breakpoint (µg/mL)			Comments
		S	I	R	S	I	R	
Penicillin G Horses (Respiratory, Soft Tissue) <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	≤0.5	I	≥2.0	(14) Breakpoints derived from microbiological, pharmacokinetic (using accepted clinical, but extra-label doses), and pharmacodynamic data. The dose of procaine penicillin G modeled was 22 000 U/kg, every 24 hours.
Bovine Respiratory Disease <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somni</i>	-	-	-	-	≤0.25	0.5	≥1.0	(15) Breakpoints derived from microbiological, pharmacokinetic (using accepted clinical, but extra-label doses), and pharmacodynamic data. The dose of procaine penicillin G modeled was 22 000 U/kg, every 24 hours.
β-Lactam/Other Class Combinations								
Penicillin-novobiocin Bovine mastitis <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>	10 units/30 µg	≥18	15-17	≤14	≤1/2	2/4	≥4/8	

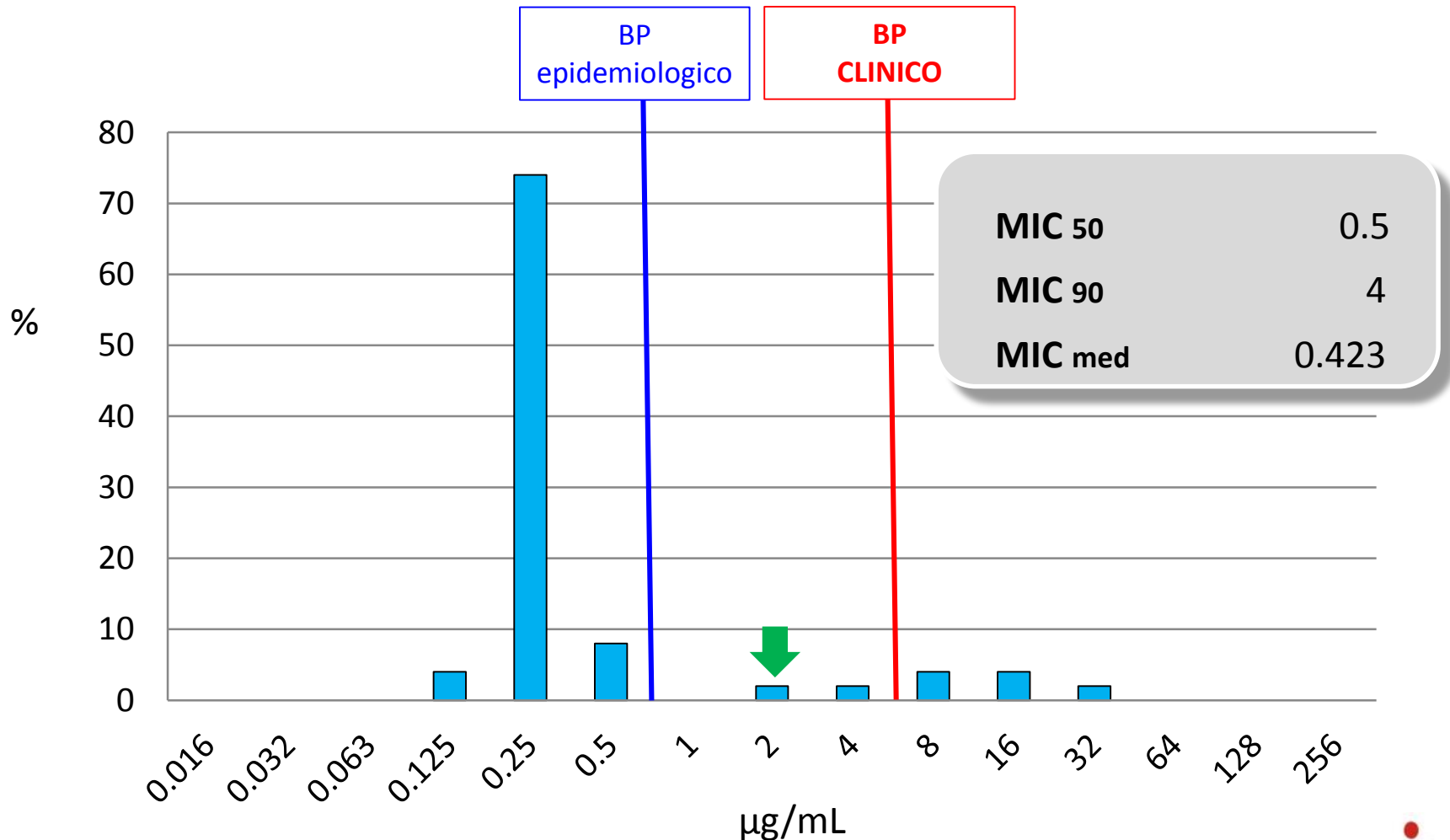
DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC)

- MIC: concentrazione più bassa di un antibatterico alla quale si osserva una visibile inibizione della crescita microbica in condizioni sperimentali definite
- Varia a seconda della specie batterica e del principio attivo considerati
- Produce un dato numerico QUANTITATIVO in $\mu\text{g/mL}$
- Il valore ottenuto è confrontabile con dati di «popolazione» (MIC_{50} , MIC_{90}), se disponibili
- Può essere eseguita su terreno solido (diluizione in agar) o liquido (diluizione in brodo)



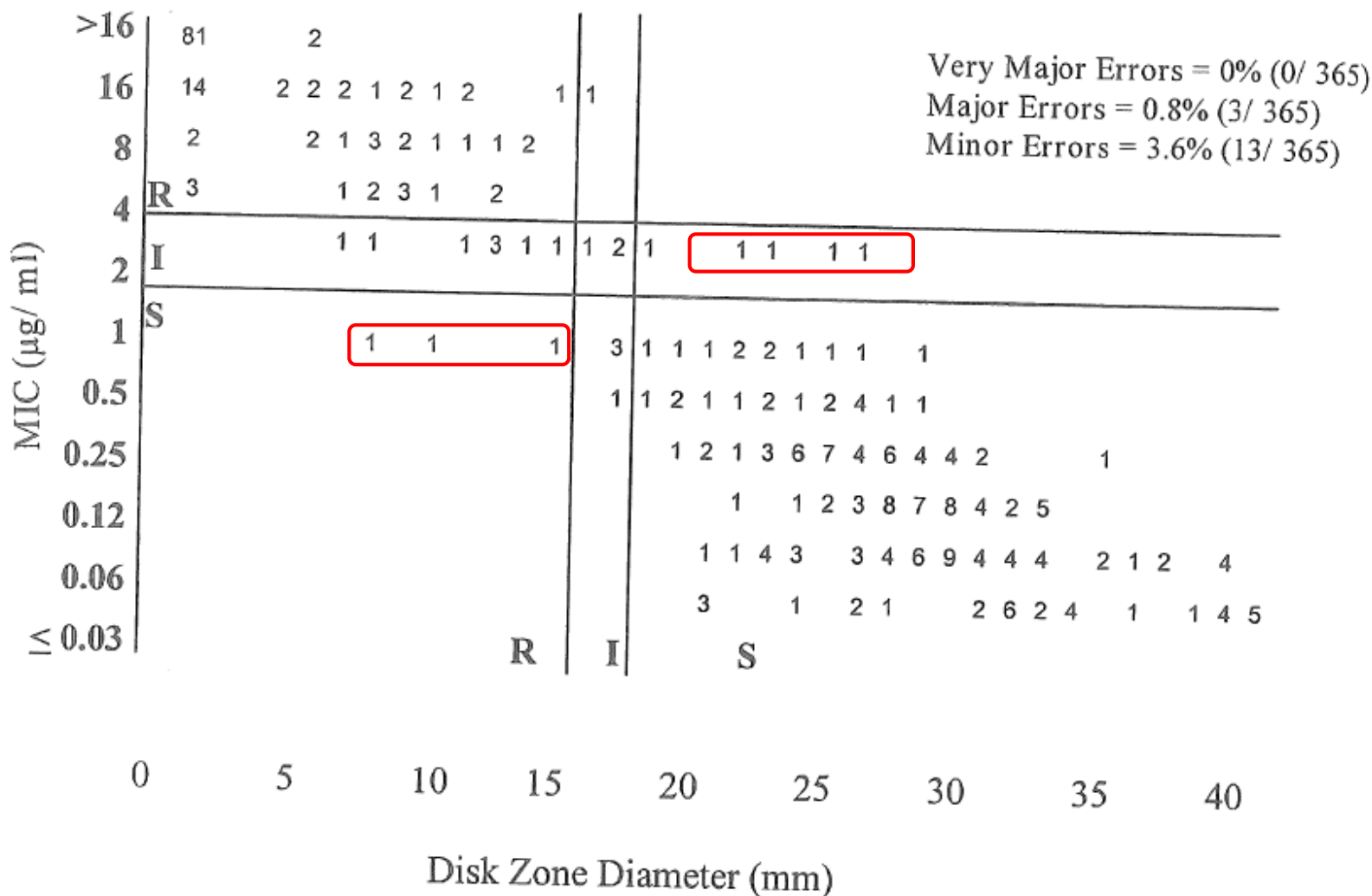
- Metodo approvato CLSI e EUCAST
- Disponibili kit commerciali pronti all'uso
- Possibile standardizzazione delle letture: spettrofotometro (opzionale)

La MIC e lo studio delle farmacoresistenze delle popolazioni microbiche



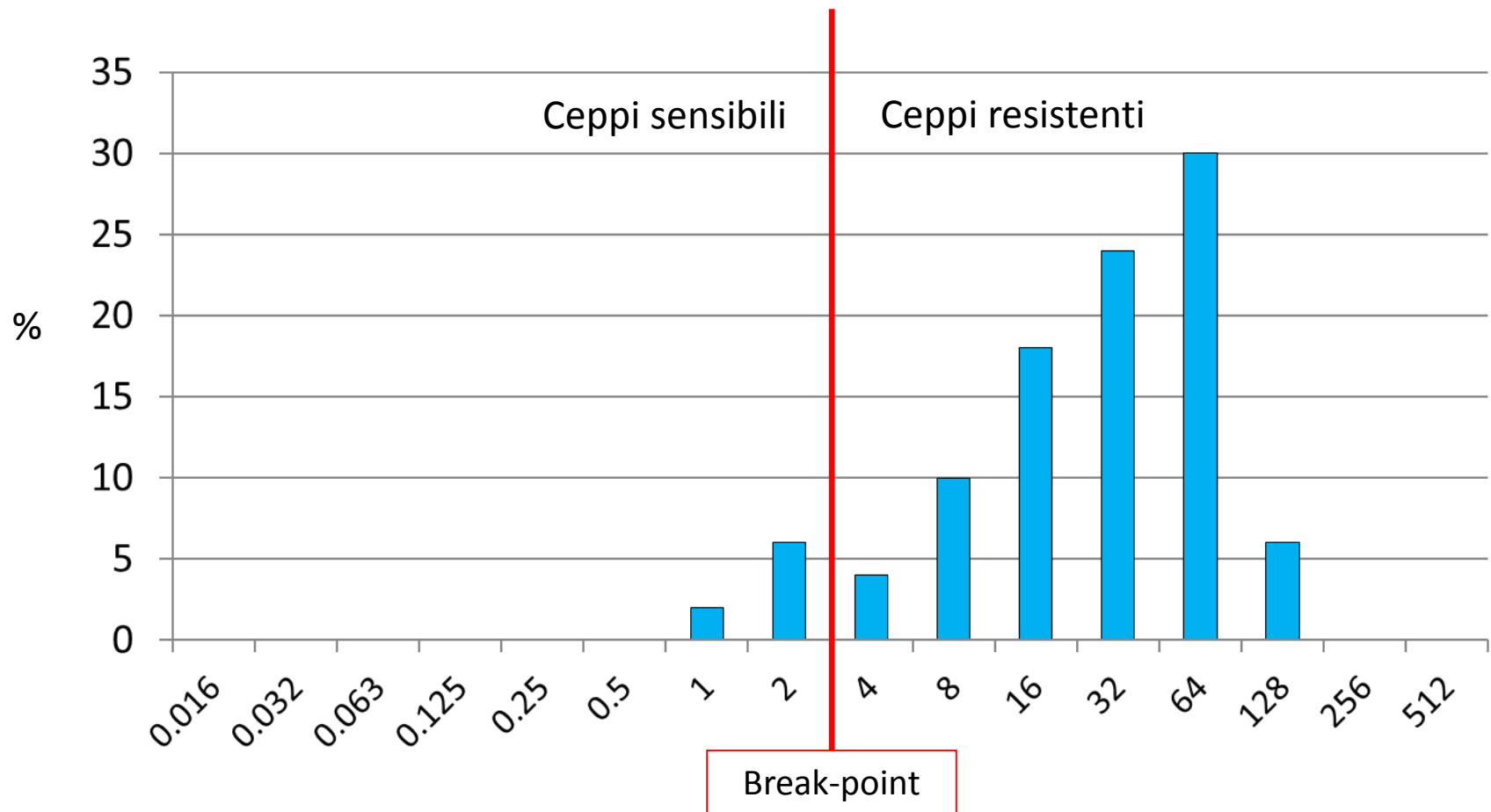
Per utilizzare nella pratica i dati di MIC è necessario disporre di **break-point clinici**

- Il **break-point clinico** definisce l'attività antimicrobica, in termini quantitativi (valore MIC o diametro alone inibiz.) che un farmaco deve manifestare *in vitro* per essere efficace nei confronti di quella **specie batterica**, localizzato in quel **tessuto/apparato**, di quella **specie animale**.
- Valore fissato da organo scientifico riconosciuto (**CLSI**, EUCAST)
- I Break point consentono di suddividere le popolazioni batteriche in **SENSIBILI**, **INTERMEDIE**, **RESISTENTI** a un particolare principio attivo.

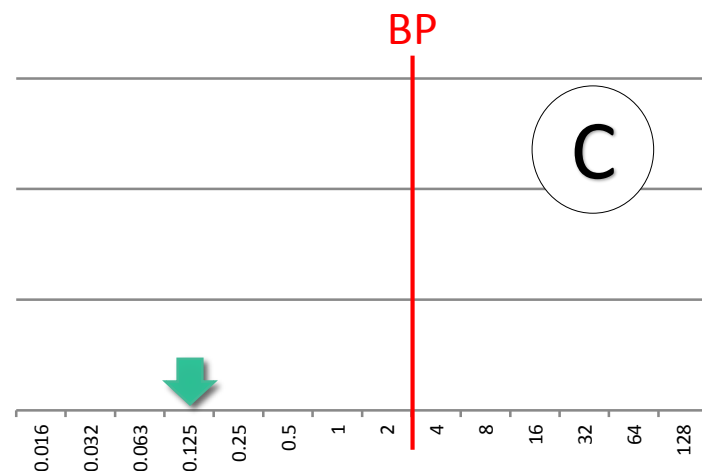
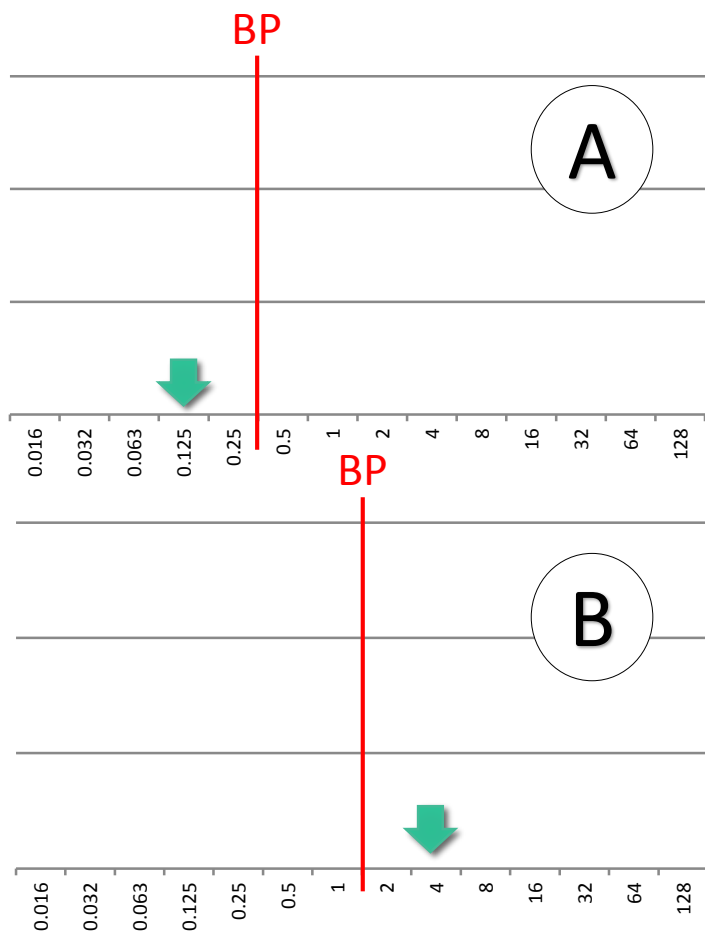


(Da Giguère et al., 2006, antimicrobial therapy in veterinary medicine)

Grazie a un BP il dato quantitativo può essere convertito in dato qualitativo



Il dato di MIC può orientare il veterinario nella scelta dell'antibiotico



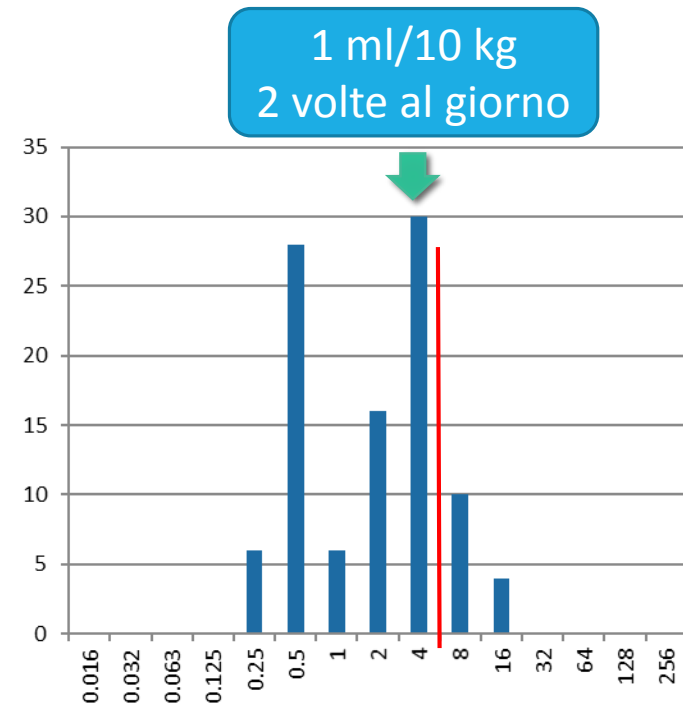
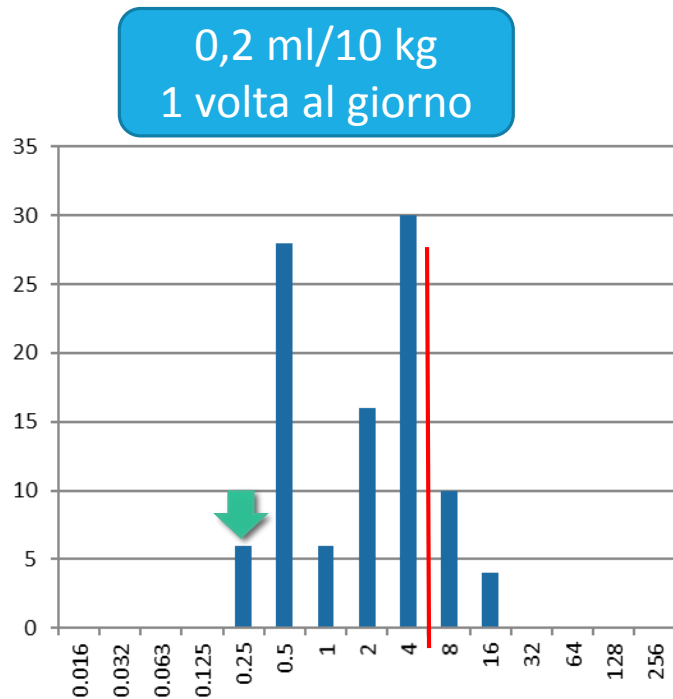
	A	B	C
BP	0,25	1	2
MIC	0,125	4	0,125
BP/MIC	2	0,125	16



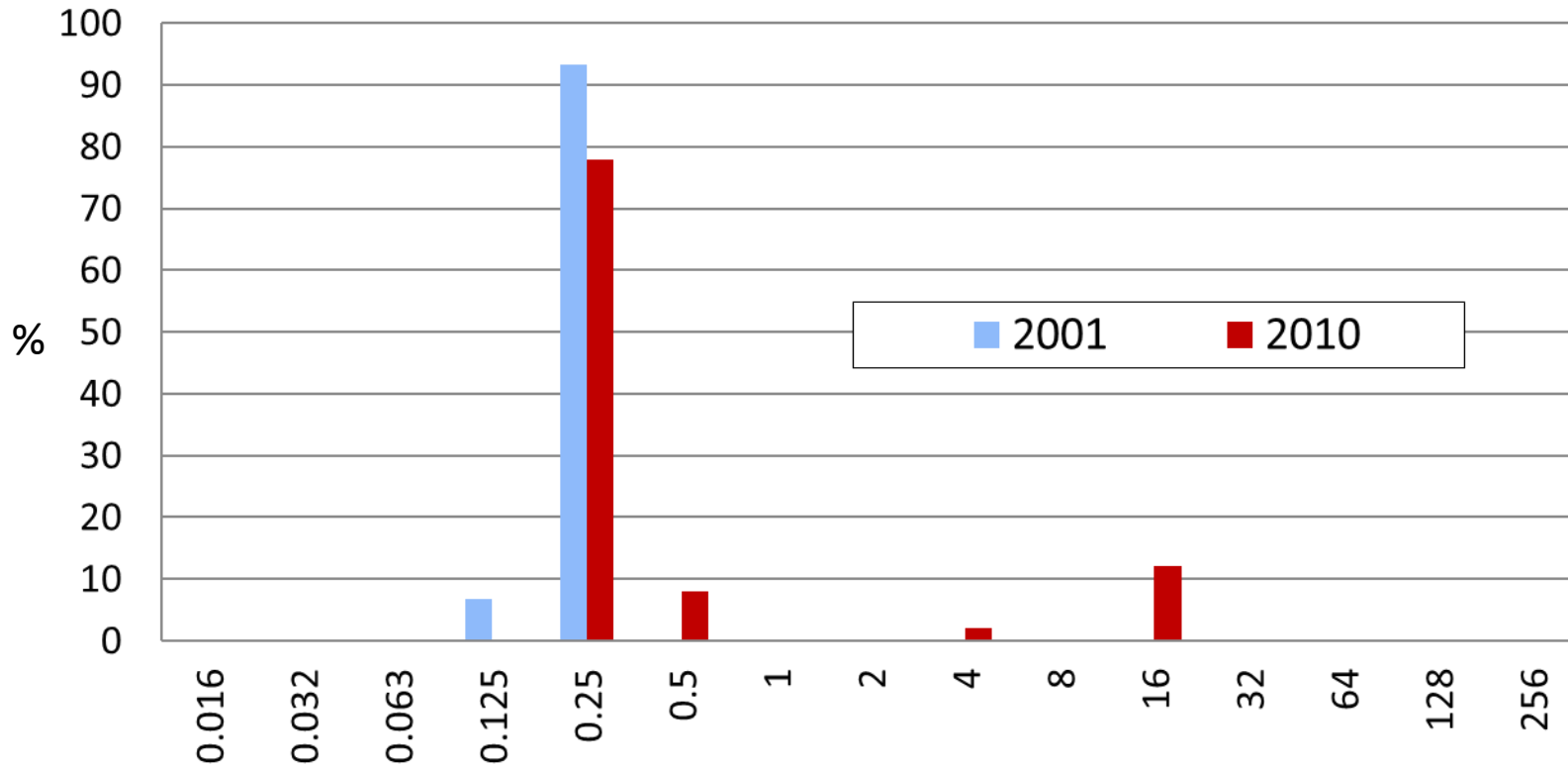
Nella scelta del farmaco non vanno comparati i valori assoluti di MIC tra le molecole, ma si prediligerà il farmaco per il quale il **rappporto BP/MIC_{ceppo}** è maggiore

Il dato di MIC può orientare il veterinario nella scelta del dosaggio dell'antibiotico prescelto

es. farmaco iniettabile: 0,2-1 ml/10 kg, 1 o 2 volte al giorno



Monitorare l'andamento delle resistenze nel tempo



Progetto BAL- MIC

- MIC eseguite solo da microrganismi isolati tramite BAL
- *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*
- I ceppi di *Mycoplasma bovis* saranno stoccati e testati in un secondo momento
- Le molecole impiegate sono rappresentative delle varie famiglie farmaceutiche e registrate nel bovino

MOLECOLA PROTOTIPO	MOLECOLE RAPPRESENTATE DAL PROTOTIPO
Ampicillina	Ampicillina, Amoxicillina, Etacillina
Oxacillina	Oxacillina, Meticillina, Cloxacillina, Nafcillina
Cefalotina	Tutte le Cefalosporine di I° generazione: Cefalotina, Cefadroxil, Cefalexina, Cefapirina, Cefradina, Cefaclor, (Cefazolina da testare separatamente per Enterobacteriaceae).
Ceftiofur (Cefotaxime)	Oxymino-cefalosporine (Ceftiofur, Cefquinome, Cefoperazone)
Cloramfenicolo	Cloramfenicolo, Tiamfenicolo
Florfenicolo	Florfenicolo, Cloramfenicolo, Tiamfenicolo
Clindamicina	Clindamicina, Lincomicina
Pirlimicina	Pirlimicina (Clindamicina, Lincomicina)
Tetraciclina	Tetraciclina, Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina
Trimethoprim-Sulfametoxazolo	Sulfamidici potenziati con Trimethoprim
Sulfissoxazolo	Tutti i Sulfonamidi
Enrofloxacin	Enrofloxacin, Danofloxacin, Ciprofloxacina, Marbofloxacina, Orbifloxacina (fluorochinolonici in genere)
Acido Nalidixico	Acido Nalidixico, Flumequine (chinolonici)
Kanamicina*	Kanamicina, (Neomicina, Framicetina)
Gentamicina*	Gentamicina
Eritromicina	Macrolidi: Eritromicina, Tilmicosina, Tulathromicina, Tilosina, (Spiramicina)
Rifampicina	Rifamicine

*Includere nei panel almeno Gentamicina e Kanamicina.

Da A. Battisti,
NRL-AR, IZSLT,
Roma

Pannello che verrà impiegato

Famiglia	Molecola	Range ($\mu\text{g/mL}$)
Tetracicline	Tetraciclina	0,125-16
Aminoglicosidi	Streptomicina	0,5-256
B-lattamine	Penicillina	0,032-4
	Amoxicillina	0,0625- 64
	Ceftiofur	0,016-32
Macrolidi	Tilmicosina	0,0625-64
Fluorchinolonici III	Enrofloxacina	0,016-16
Sulfamidici potenziati	Sulfamethoxazolo + thrimethoprim	0,0625/1,1875 – 32/608
Amfenicoli	Florfenicolo	0,032-64

FAC-simile esito

L'importanza di produrre dati recenti dal nostro territorio.....

Veterinary Microbiology 172 (2014) 202–215



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study



Anno de Jong^{a,b,*}, Valérie Thomas^{a,c}, Shabbir Simjee^{a,d}, Hilde Moyaert^{a,e},
Farid El Garch^{a,f}, Kirsty Maher^{g,1}, Ian Morrissey^{g,2}, Pascal Butty^{a,h},
Ulrich Klein^{a,i}, Hervé Marion^{a,j}, Delphine Rigaut^{a,k}, Michel Vallé^{a,l}

Table 3b

MIC distribution frequencies of *M. haemolytica* cattle isolates from the EU 2002–2006.

Antimicrobial Agent	<i>M. haemolytica</i> (n = 138)																			MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	S (%)	I (%)	R (%)
	MIC values (µg/mL)																							
	0.002	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512					
Amoxicillin						16	42	63	9	1		1	2	1	1	2				0.25	0.5	-	-	-
Amoxicillin/clavulanic acid ^a							73	58	7											0.12	64	100.0	0.0	0.0
Cefquinome		28	46	51	12	1														0.008	0.015	-	-	-
Ceftiofur	5	47	63	16	7															0.008	0.015	100.0	0.0	0.0
Cephalexin						1			19	43	72	3								2	2	-	-	-
Danofloxacin			1	10	68	44	6	4	5											0.03	0.12	96.4	-	-
Enrofloxacin		5	18	89	12	2	8	4												0.03	0.12	97.1	2.9	0.0
Marbofloxacin			3	34	47	39	7	4	3	1										0.03	0.12	-	-	-
Florfenicol							7	59	70	2										1	1	100.0	0.0	0.0
Doxycycline ^b							5	28	15	2	1	4	1							0.25	2	-	-	-
Tetracycline ^b							1	17	51											1	16	84.2	1.2	14.6
Tiamulin								2	1											16	16	-	-	-
Tilmicosin								2	1	39	57	32	5				2			4	8	95.0	3.6	1.4
Tylosin									2		1		5	61	67	2				32	64	-	-	-
Lineomycin											2	1	6	116	13					≥32	≥32	-	-	-
Trimetho/sulfamethoxazole ^c			35	89	7	1	5	1												0.03	0.06	100.0	0.0	0.0
Spectinomycin												13	34	90	1					32	32	99.3	0.7	0.0

Table 2
Number of isolates per country.

Host	Bacterial species	Be	CR	Dk	Fr	Ge	Ir	It	Nl	Pl	Sp	UK	Total
Cattle	<i>P. multocida</i>	4	18	-	41	50	36	51	3	-	-	28	231
	<i>M. haemolytica</i>	1	10	-	35	27	20	31	0	-	-	14	138
Pigs	<i>P. multocida</i>	15	-	37	37	47	-	4	20	20	12	38	230
	<i>A. pleuropneumoniae</i>	13	-	64	33	34	-	1	16	19	8	32	220
	<i>S. suis</i>	8	-	29	29	34	-	2	27	22	12	19	182

-: no isolates from the country and species were included in the programme.

In attesa dei risultati dei test diagnostici la terapia d'urgenza dovrebbe basarsi su:

1. Dati di farmacosenibilità **recenti**
2. Ottenuti da un **numero significativo di ceppi**
3. Ottenuti **dal territorio**

Piastre IZSVe per MIC

1. Pannello per patogeni respiratori (BOVINO – SUINO)
2. Pannello clostridi
3. Pannello *Brachyspira* spp. (IZS Tv)
4. Pannello Micoplasmi (IZS Pd)



Criteri di scelta

- Privilegiare molecole di «prima scelta» registrate
- Brak-point disponibili
- Range che includesse il/i brek point
- Diluizioni di antimicrobico aumentate più nel range di «sensibilità» per consentire una comparazione (BP/MIC)
- Range studiato in base ai risultati di studi di farmacosensibilità oggi disponibili in bibliografia (possibili modifiche future)
- MIC inizialmente disponibili in 3 laboratori IZSve: PD, PN, TV

SWINE & BOVINE RESPIRATORY SYNDROME**µg/ml**

TET	TETRACICLINE	0,032-16
SX-T	SULFAMETHOXAZOLE +TRIMETHOPRIM	0,016-32
AMPI	AMPICILLIN	0,016-8
SPE	SPECTINOMYCIN	1-256
ENRO	ENROFLOXACIN	0,016-8
AM-C	AMOXICILLIN+CLAVULANIC ACID	0,064-32
CFTIO	CEFTIOFUR	0,016-8
TILMIC	TILMICOSIN	0,125-64
FFC	FLORFENICOL	0,064-64
C+	GROWTH CONTROL	

GRAM-NEGATIVE PLATE**µg/ml**

COL	COLISTIN	0,016-16
FFC	FLORFENICOL	1-64
APRA	APRAMYCIN	0,25-64
AMINO	AMINOSIDINE	0,064-16
GENTA	GENTAMICIN	0,064-32
TET	TETRACICLINE	0,125-16
SX-T	SULFAMETHOXAZOLE +TRIMETHOPRIM	0,5-16
FLU	FLUMEQUINE	0,25-32
ENRO	ENROFLOXACIN	0,016-16
AMPI	AMPICILLIN	0,032-8
C+	GROWTH CONTROL	

ANAEROBIC**µg/ml**

TYL	TYLOSIN	0,064- 128
DOXY	DOXYCYCLINE	0,25-16
AMPI	AMPICILLIN	0,016-16
PEN	PENICILLIN	0,032-32
VAL	VALNEMULIN	0,064-32
TIA	TIAMULIN	0,125-64
BAC	BACITRACIN	0,064-32
ENRO	ENROFLOXACIN	0,25-256
TILMIC	TILMICOSIN	0,125-32
C+	GROWTH CONTROL	

MICOPLASMI**µg/ml**

DOXI		0,125-32
FFC	FLORFENICOLO	0,5-16
TIA	TIAMULINA	0,007-16
LIN	LINCOMICINA	0,5-32
ERY	ERITROMICINA	0,5-8
TIL	TILMICOSINA	0,016-32
TYL	TILOSINA	0,007-32
OTC	OSSITETRACICLINA	0,5-32
ENRO	ENROFLOXACIN	0,125-16
C+	GROWTH CONTROL	

Berto Giacomo

gberto@izsvenezie.it

Bano Luca

lbano@izsvenezie.it

Sezione Diagnostica di Treviso

Vicolo Mazzini 4, 31012 Villorba di Treviso

tel. 0422 302302