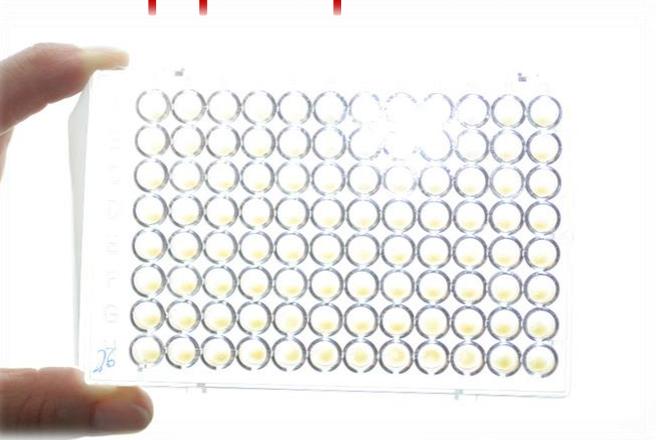


La MIC per una strategia terapeutica appropriata



Luca Bano

Laboratorio di Diagnostica Clinica e Batteriologia Speciale

Sezione di Treviso

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Legnaro, 26/10/2016

Parleremo di....

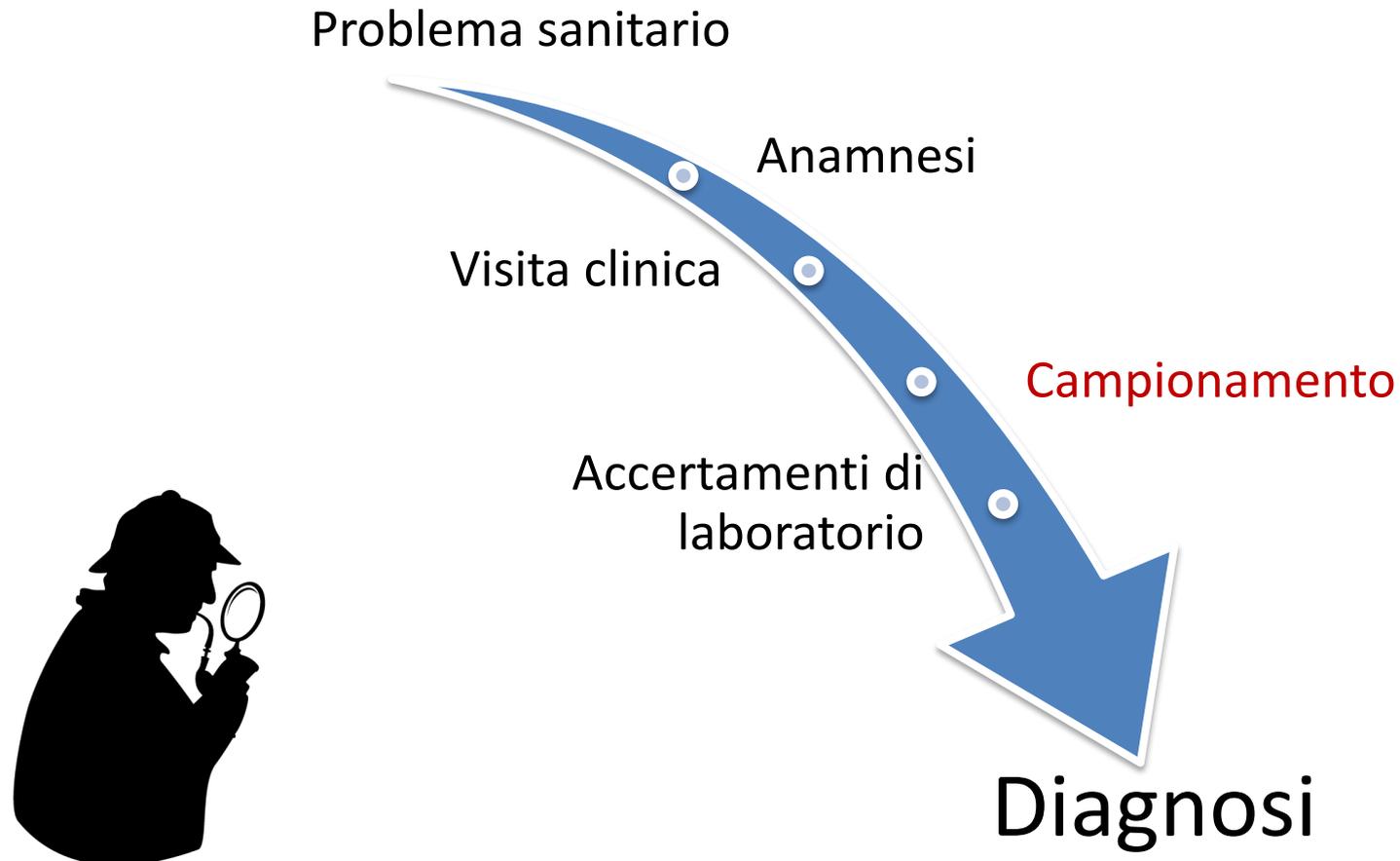
- L'importanza della diagnosi nel processo terapeutico
- Un nuovo elemento nella scelta del farmaco: prudent use
- I test di farmacosenibilità: quesiti pre-analitici
- I test di farmacosenibilità: quali possibilità?
- Il concetto di MIC e di MBC
- MIC: quali vantaggi rispetto all'antibiogramma
- News da IZSve: la MIC a servizio del settore buiatrico

Perché fare diagnosi?



1. Ridurre il danno economico derivante dalla malattia
2. Mirare la terapia evitando i costi di trattamenti farmacologici sbagliati
3. Verificare la bontà dei protocolli vaccinali
4. Ridurre il rischio di selezione di microrganismi farmacoresistenti

Il corretto iter diagnostico



Il campionamento

Un buon campionamento è alla base di una corretta diagnosi

www.izsvenezie.it > Servizi offerti > Campionamento

Da considerare

- Momento del campionamento
- Tipo campione: singolo vs pool
- Numerosità campionaria: esito individuale vs esito di gruppo
- Trattamenti terapeutici in corso
- Modalità conservazione e trasporto campioni



Iter post-diagnostico

Diagnosi

Terapia

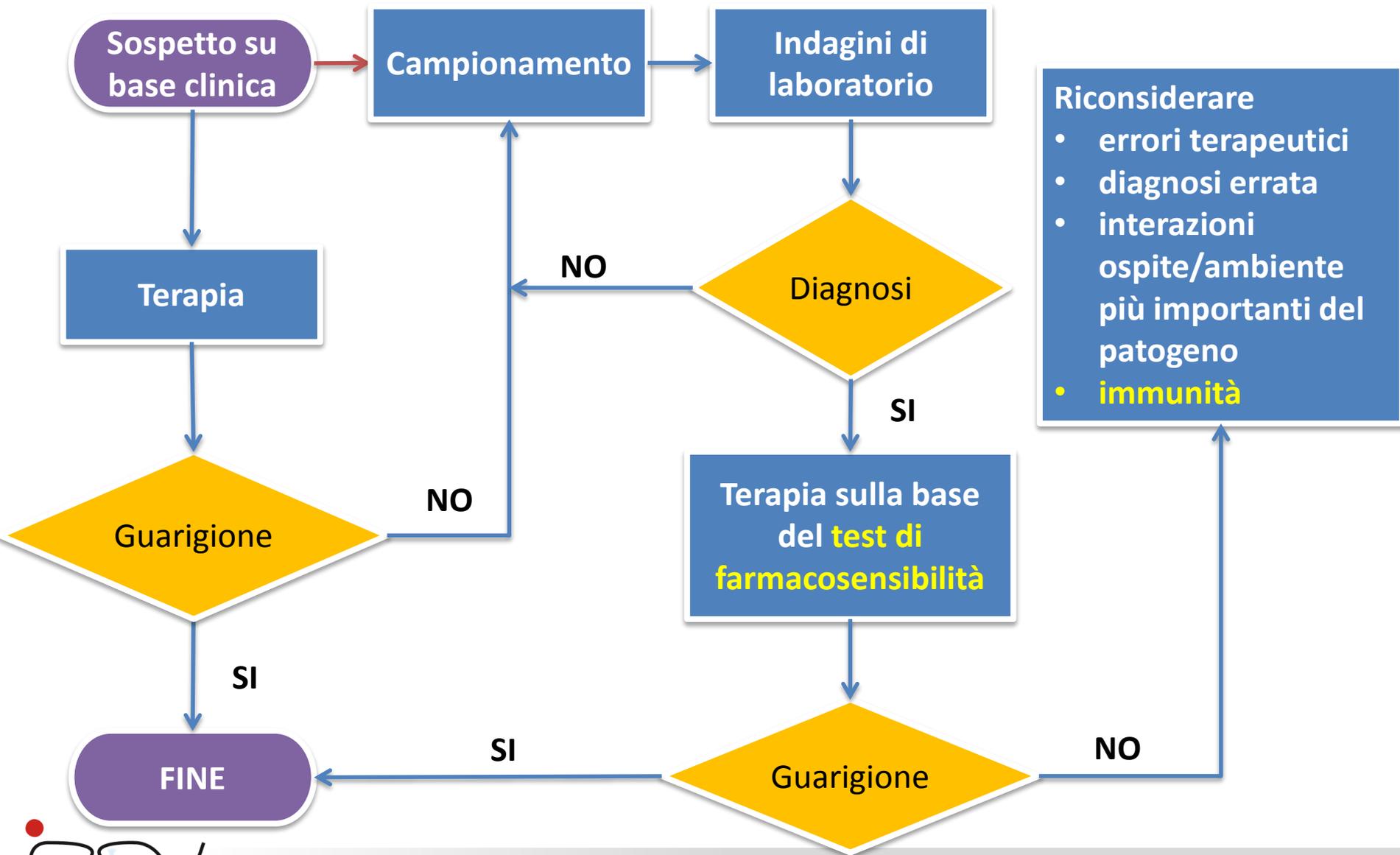
Profilassi diretta

Revisione dei
protocolli vaccinali

Soluzione del problema



Il processo diagnostico e terapeutico



Fattori che influenzano la scelta terapeutica

Aspetti tecnici

- corretta diagnosi
- Test di farmacosenibilità
- PK/PD

Aspetti economici

- costo della terapia
- tempi di sospensione
- somministrazione
- influenza dell'allevatore (?)



PRUDENT USE:
evitare l'insorgenza di
batteri farmaco-resistenti,
per l'uomo

11/09/2015

COMMISSION NOTICE

Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine

(2015/C 299/04)

3 Importanza della diagnosi e dei test di farmacosenibilità

3.1

- Limitare l'impiego dei CIA. Utilizzarli solo dopo che test di laboratorio abbiano decretato l'inefficacia degli altri antimicrobici
- Idem per uso off-label
- Trattare solo gli animali malati o altri animali solo in base a fondate ragioni epidemiologiche
- Migliorare le condizioni ambientali di allevamento e implementare quelle profilattiche: vaccini

In alcuni Stati UE non per decreto, ma per decisione condivisa delle associazioni veterinarie

6.4 Bovini e piccoli ruminanti



Tipologie e fasi d'allevamento «critiche» per l'uso di antibiotici:

1. vitelli a carne bianca attraverso il latte ricostituito
2. vacche da latte in asciutta

Le misure da prendere sono le seguenti:

- evitare l'uso profilattico del farmaco nei vitelli attraverso il latte
- implementare strategie alternative quali vaccinazione e una buona colostratura
- evitare i trattamenti sistematici nelle bovine in asciutta
- migliorare le pratiche che concorrono ad evitare la diffusione di mastiti in allevamento (igiene, buone pratiche di allevamento)
- non somministrare ai vitelli il latte di bovine trattate con antimicrobici

Test di farmacosenibilità: le scelte del laboratorista in seguito a positività all'esame batteriologico

Test di farmacosenibilità: quesiti pre-analitici in laboratorio



1. Al veterinario curante seve il test di farmacosenibilità?
2. Quale/i microrganismo/i sottoponiamo al test?
3. Quale test utilizziamo?
4. Quali principi attivi testiamo?
5. Quali criteri interpretativi applichiamo? (break point)

1. Quando serve il test di farmacosenibilità

- L'isolato ha note caratteristiche di **contagiosità** e viene ritrovato in **più soggetti** (es. mastiti da microrganismi contagiosi, cheratocongiuntivite da *M. bovoculi*)
- L'isolato batterico proviene dall'unico **soggetto deceduto** ma vi è una **patologia diffusa** in allevamento (es. BRD del bovino da carne)
- Il microrganismo trovato non ha caratteristiche di contagiosità ed è stato isolato da un unico animale **sintomatico** che il veterinario vuole trattare, anche per ragioni di benessere animale (es. cistite batterica, pododermatite, ecc.)

2. Quali microrganismi sottoporre al test?

1. Batteri riconosciuti come **PATOGENI** per la specie animale e l'apparato in esame (es. *Str. agalactiae* nel latte mastitico)
2. Batteri non noti come «patogeni», ma **ISOLATI DA ORGANI O TESSUTI FISIOLGICAMENTE STERILI** o con bassa carica microbica
3. Specie batterica normalmente presente nel distretto d'isolamento, ma che, in particolari condizioni ambientali o se dotati di **FATTORI DI VIRULENZA** noti, potrebbero rivestire un ruolo patogeno per l'animale (es. *E. coli* nell'enterite del vitello).

NB. Anche altri microrganismi in relazione a **PUREZZA** della coltura e **CARICA** batterica + input anamnestici e clinici...

E nella mastite?

Caratteristiche	Microrganismi	TEST di farmacosenibilità
Contagiosi	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Str. agalactiae</i> • <i>S. aureus</i> • <i>Corynebacterium bovis</i> • <i>Mycoplasma bovis</i> 	<p>Sempre</p> <p>Sempre</p> <p>Valutare carica e purezza</p> <p>Prendere accordi col lab.</p>
Ambientali/ contagiosi	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Str. dysgalactiae</i> • <i>Str. uberis</i> • <i>Staphy. Coag +</i> • <i>Staphy. Coag -</i> • <i>Trueperella pyogenes</i> 	<p>Valutare carica, purezza e diffusione nel gruppo</p>
Ambientali	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus spp.</i> • <i>E. coli</i> • <i>Altre enterobacteriaceae</i> 	<p>Mai*</p> <p>Valutare carica e purezza</p> <p>Valutare carica e purezza</p>
Sporadici	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pasteurella multocida</i> • <i>Y. pseudotuberculosis</i> 	<p>Sempre</p> <p>Sempre</p>

* oltre a carica e purezza, considerare anche la **frequenza d'isolamento** in campioni dello stesso gruppo

3. Quale test utilizziamo

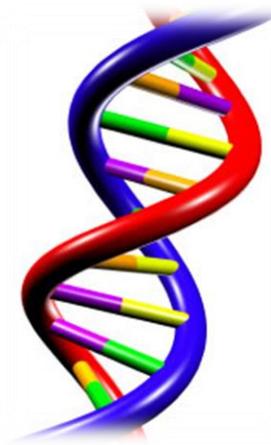
METODI GENOTIPICI

- PCR
- MICROARRAY



METODI «FENOTIPICI»

- Metodo KIRBY-BAUER (Antibiogramma)
- Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)
- Metodo a gradiente predefinito (E-TEST)



1. Metodi genotipici

Si basano sulla ricerca del gene che codifica il meccanismo di resistenza. Ad esempio:

- **pompe di efflusso**: ad es. alcuni geni *Tet* (*tetracicline*), gene *MefA* (*macrolidi*, *lincosamidi*, *streptogramina B*),
- **enzimi** che degradano o alterano il principio attivo (es. geni codificanti β -lattamasi; *gene MCR-1* per colistina)
- sostituzione o alterazione del **target dell'antibiotico** (*MecA*, *Erm*)

— 1. Metodi genotipici —



- **Rapidi** (l'isolato può essere testato in giornata)
- Metodi **standardizzabili** intra- inter-laboratorio
- Metodo d'elezione per geni importanti in terapia umana (es. *mecA*)



- In molti casi la presenza del gene non ne garantisce **l'espressione**
- I meccanismi di resistenza possono essere complessi perché regolati da **molteplici geni**, e non tutti sono noti
- Per alcuni geni non esistono controlli positivi disponibili e certificati

2. Metodi fenotipici



- prevedono il contatto diretto tra il farmaco e il microrganismo in esame
- Le modalità d'esecuzione e l'interpretazione dei test sono definite da laboratori di referenza internazionali: CLSI (USA), EUCAST (EU)
- metodo Kirby Bauer (antibiogramma); test a gradiente predefinito (E-test); **determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)**;

**TUTTI I METODI FENOTIPICI SI BASANO DIRETTAMENTE
O INDIRETTAMENTE SUL CONCETTO DI MIC**

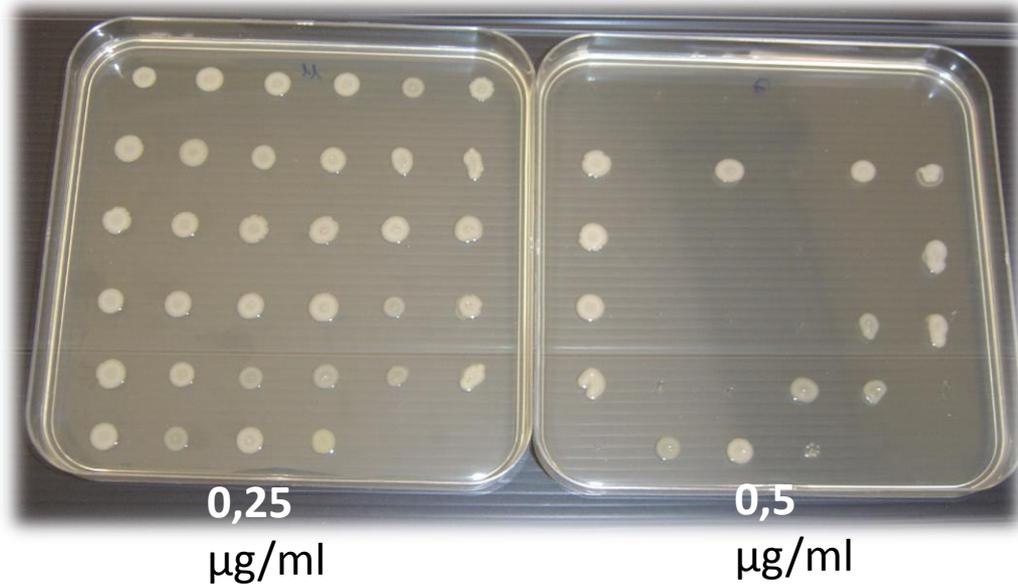
Cos'è la MIC?

- **MIC**: (**minima concentrazione inibente**) concentrazione **più bassa** di un antibatterico alla quale si osserva una **visibile inibizione della crescita** microbica, in condizioni sperimentali definite
 - **MBC** (**minima concentrazione battericida**): concentrazione minima di un antibatterico in grado di uccidere una coltura microbica pura
 - **MIC₅₀** e **MIC₉₀**: in uno studio di farmacosenibilità di popolazione, sono i valori di antibatterico che inibiscono la crescita rispettivamente del 50% e del 90% dei ceppi testati
- Sono espressi in termini **QUANTITATIVOI** in $\mu\text{g/mL}$ (o mg/L)
- Può essere eseguita su terreno solido (**diluizione in agar**) o liquido (**diluizione in brodo**)

MIC: diluizione in agar

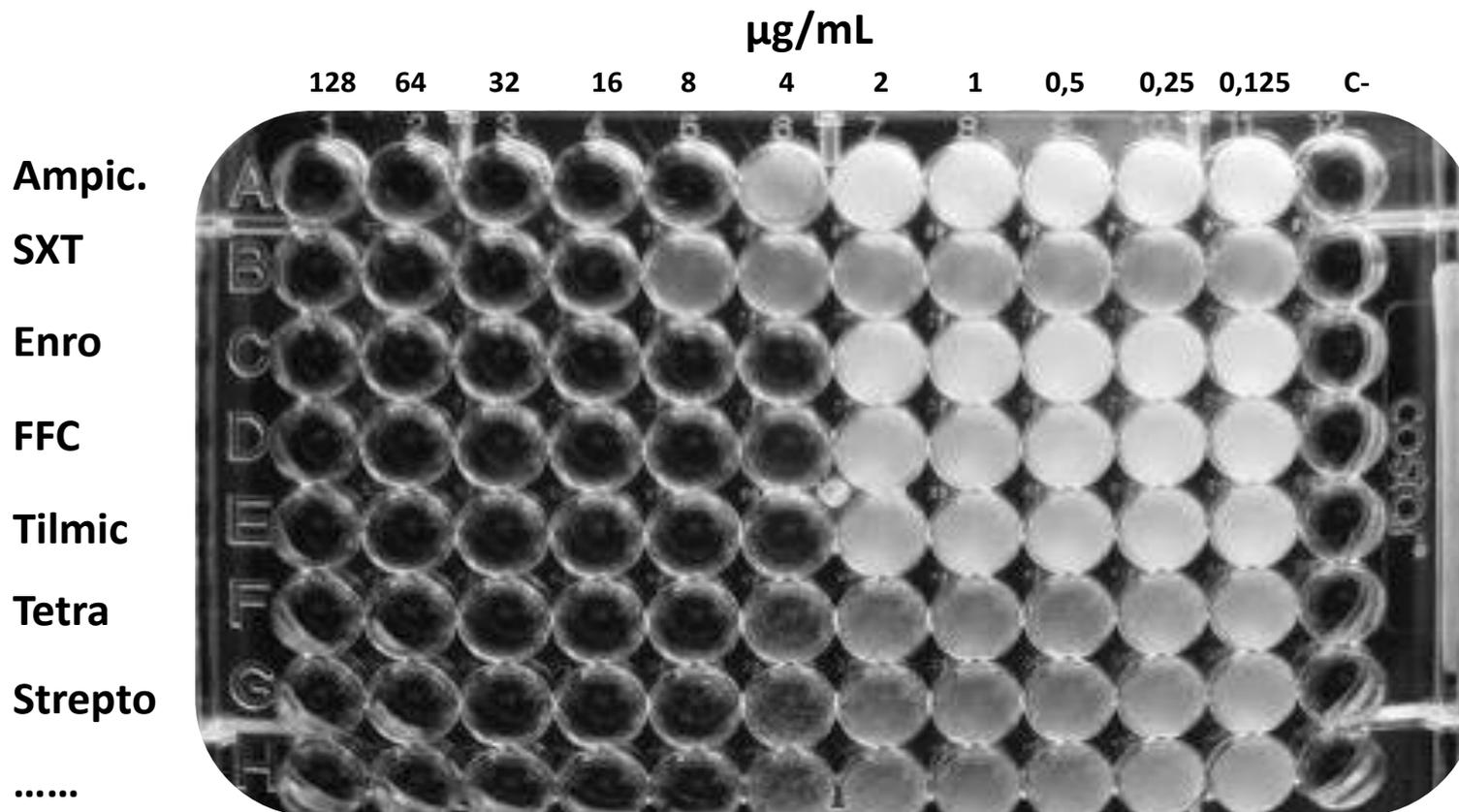


- Dato non suscettibile ad interpretazioni
- Impiego di controlli di qualità in ogni piastra (intra-run)
- Metodo raccomandato CLSI e EUCAST per la quasi totalità dei microrganismi, anaerobi Gram + inclusi (non micoplasmi umani)



- Non applicabile di routine per: disponibilità materiali, tempi, costi

MIC: diluizione in brodo



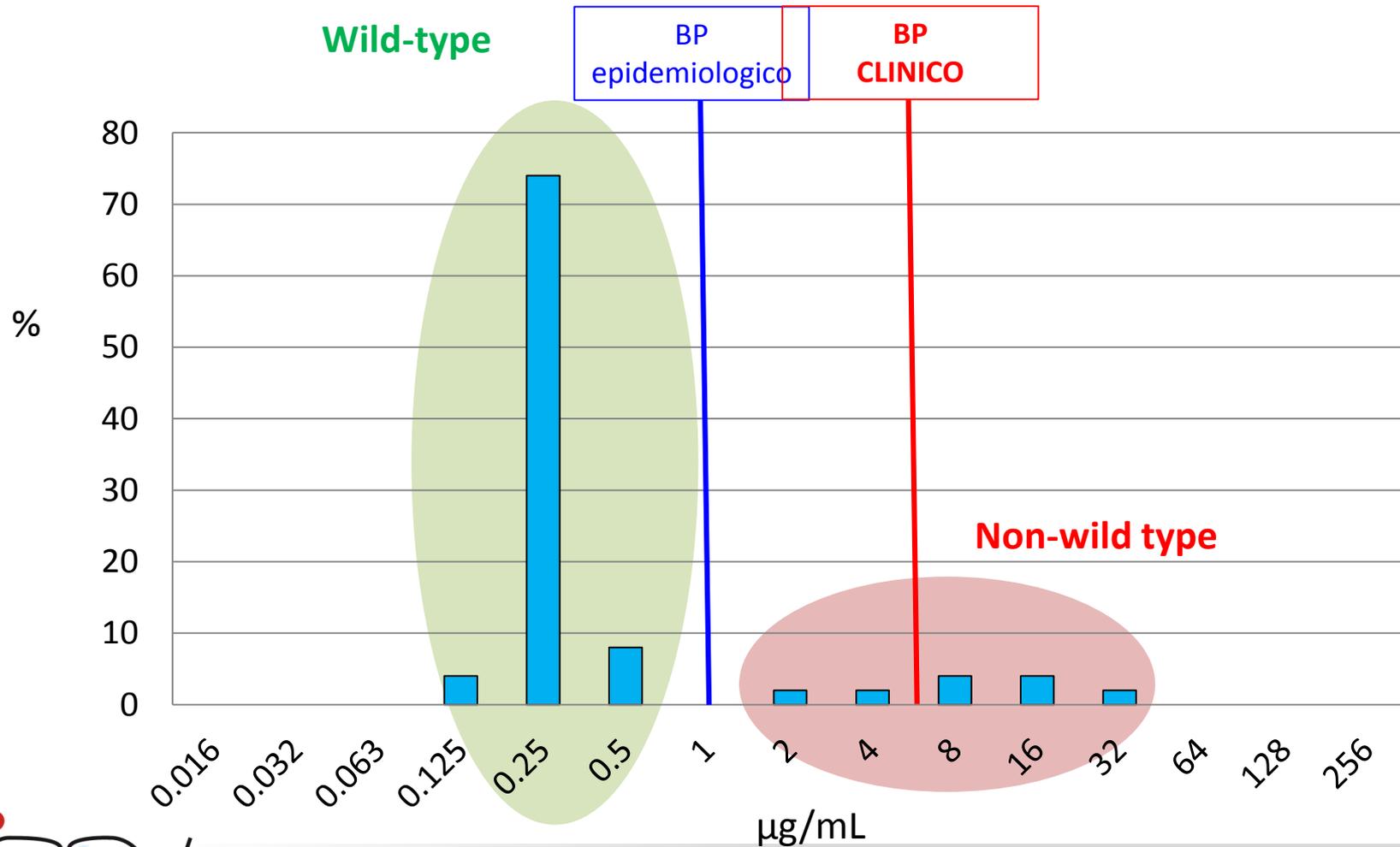
Come trasferire nella pratica terapeutica il risultato del test di farmacosensibilità?

Break-point



- Il valore di MIC ottenuto *in vitro*, non è utilizzabile nella pratica se non si dispone di un criterio interpretativo
- Questo criterio si chiama **Break point**
- Il break-point è il valore della concentrazione di un antimicrobico che applico per classificare i ceppi testati come **SENSIBILI** o **RESISTENTI** oppure come appartenenti a una classe **INTERMEDIA** tra le due
- I break-point possono essere determinati su base epidemiologica o clinica

Il break-point epidemiologico

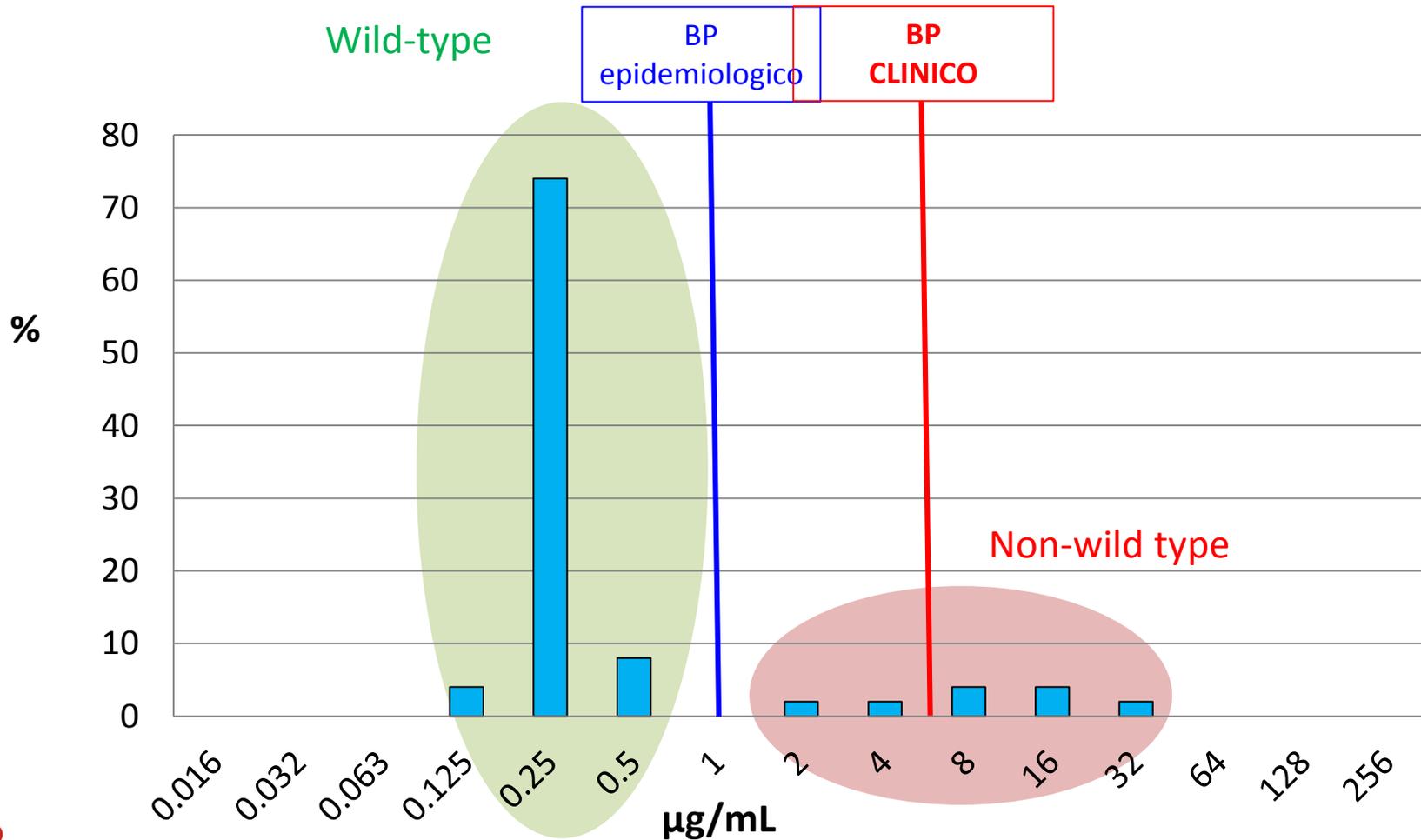


Il break-point clinico

Viene studiato in un modello animale: per il farmaco veterinario dovrebbe essere la stessa specie target

1. Acquisizione «in vivo» dei parametri di PK/PD (animali sani, tessuti target o concentrazione plasmatica?)
2. La concentrazione di antimicrobico che raggiunge il sito target, viene correlata alla probabilità di ottenere un esito clinicamente apprezzabile
3. «aggiustamento» dei parametri di PK/PD correlando valori di MIC con i benefici ottenuti in studi clinici

Break-point clinico VS epidemiologico



Kirby Bauer (antibiogramma)



- rapido
- economico
- Fornisce un **risultato qualitativo** (R, S, I)

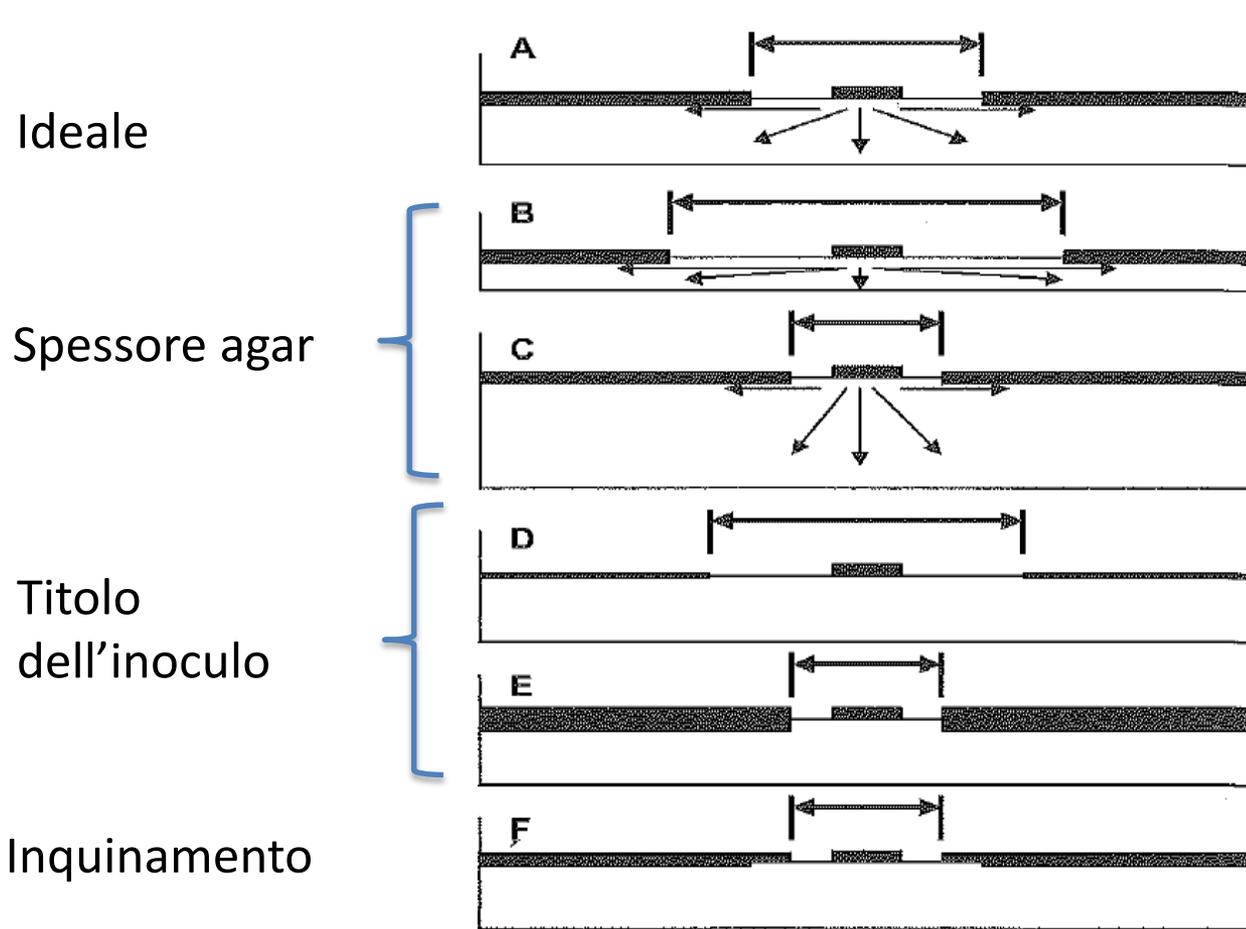


- Metodo **non applicabile** a per tutte le specie batteriche (Anaerobi, *Micoplasmi*, *Listeria spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Haemophilus spp.*, ecc)
- **Criteri interpretativi assenti** per molte molecole d'interesse veterinario e a volte forniti da ditte farmaceutiche
- L'esecuzione, per quanto semplice, richiede frequenti **controlli qualità** poiché è soggetta a **molte variabili** (inoculo, terreno, dischetto, diffusibilità farmaco, misurazione diametri, ecc.)

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter (mm)			MIC Breakpoint (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
Penicillin G Horses (Respiratory, Soft Tissue) <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	—	—	—	—	≤0.5	1	≥2.0
Bovine Respiratory Disease <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somni</i>	—	—	—	—	≤0.25	0.5	≥1.0
Tetracyclines							
Bovine Respiratory Disease <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somni</i>	—	—	—	—	≤2	4	≥8
Swine Respiratory Disease <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Streptococcus suis</i>	—	—	—	—	≤0.5	1	≥2

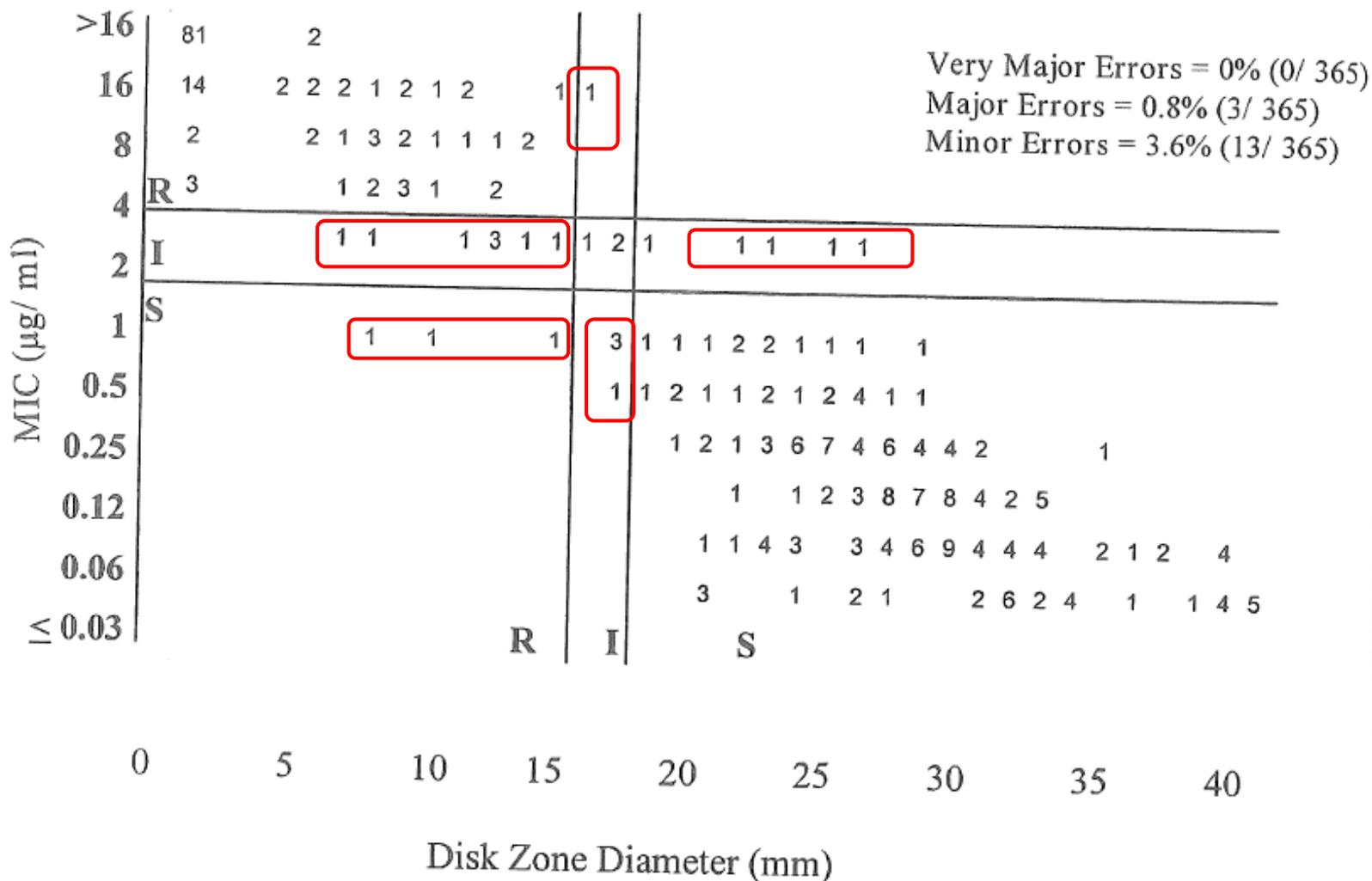


Possibili criticità nell'esecuzione dell'antibiogramma



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

Possibili discrepanze tra risultati di MIC e del metodo KB

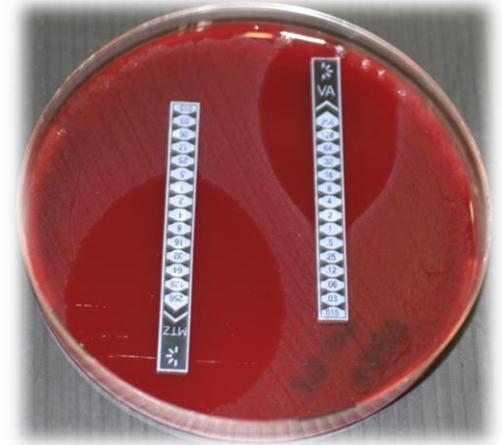


(Da Giguère et al., 2006, antimicrobial therapy in veterinary medicine)

Test a gradiente predefinito o E-TEST



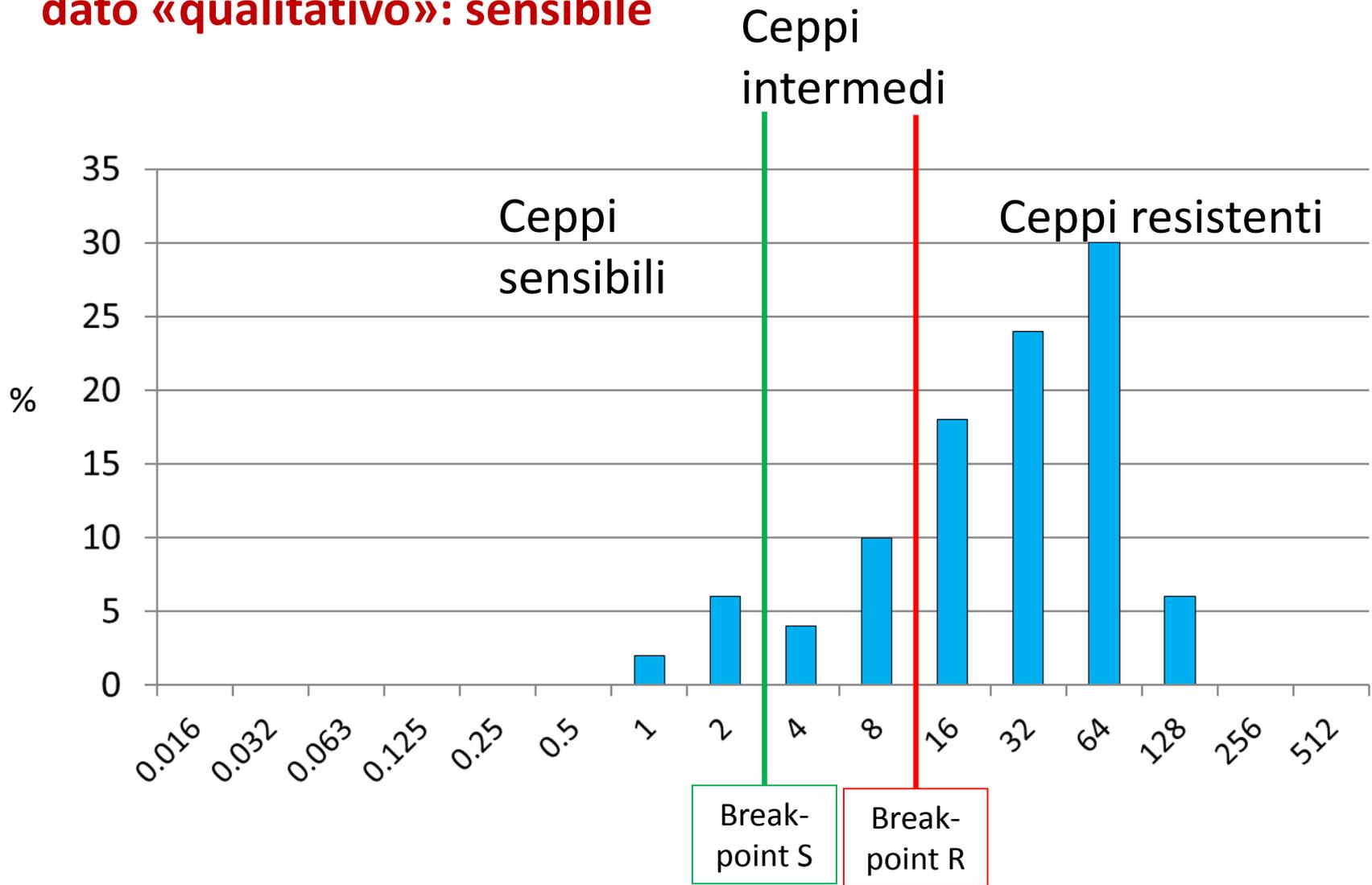
- Rapido
- Di facile esecuzione
- Fornisce un valore quantitativo



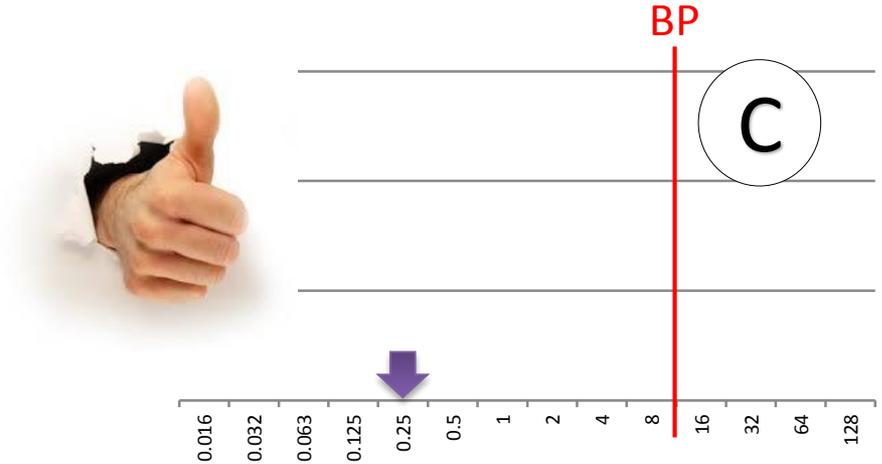
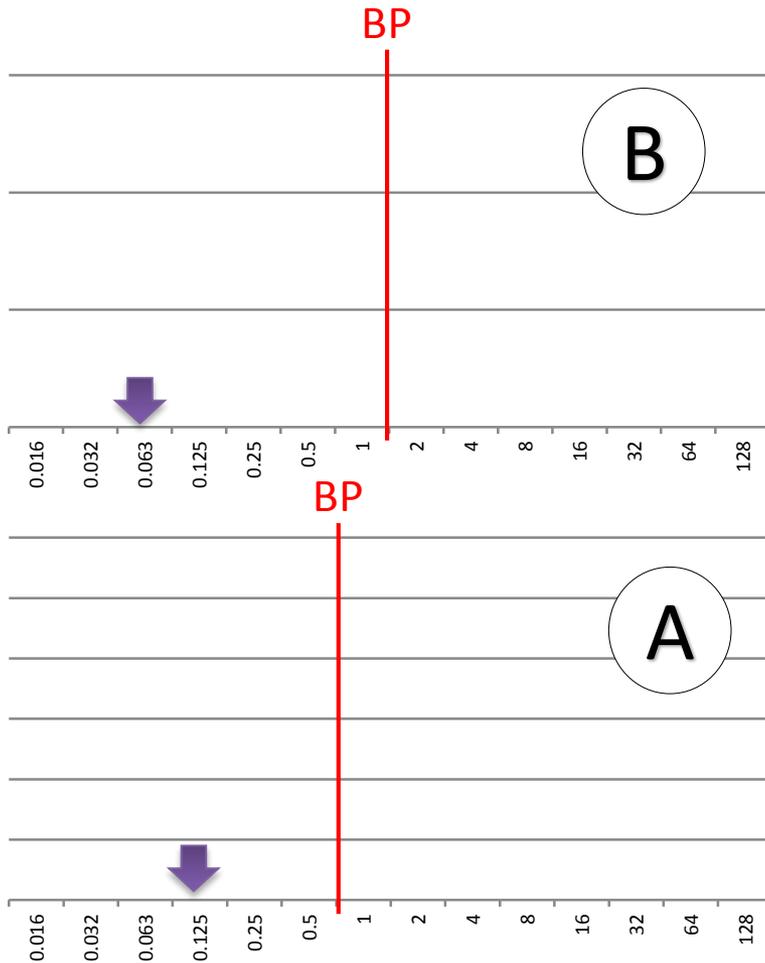
- Difficile interpretazione quando i valori sulla strip sono troppo ravvicinati
- Non esistono strips per molte molecole d'interesse veterinario
- Metodo non applicabile a molte specie batteriche «fastidiose» e anaerobi
- Costoso rispetto ad altri metodi fenotipici

Applicazioni pratiche delle informazioni fornite dalla determinazione della MIC del singolo ceppo batterico isolato

1. Grazie a un BP il dato quantitativo può essere convertito in dato «qualitativo»: sensibile



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



	A	B	C
MIC	0,125	0,064	0,25
BP	≤ 0,5	≤ 1	≤ 8
BP/MIC	4	16	32

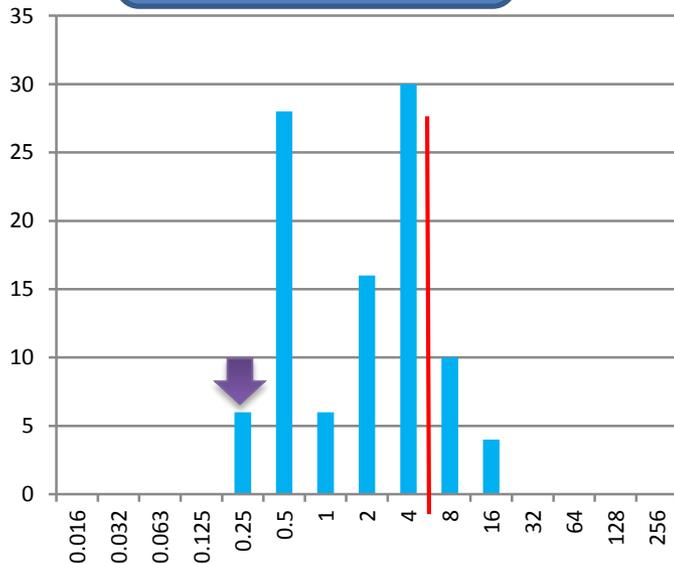
Nella scelta del farmaco non vanno comparati i valori assoluti di MIC tra le molecole, ma si prediligerà il farmaco per il quale il **rappporto BP/MIC_{ceppo}** è maggiore

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

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

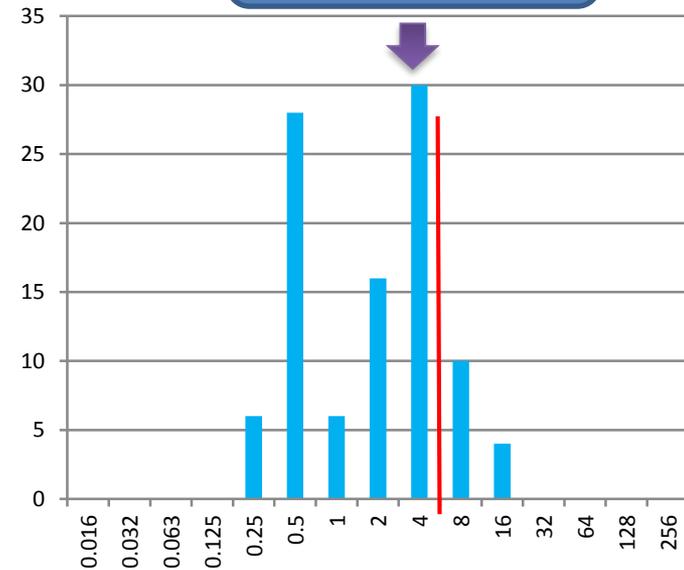
BP/MIC = 16

0,2 ml/10 kg
1 volta al giorno

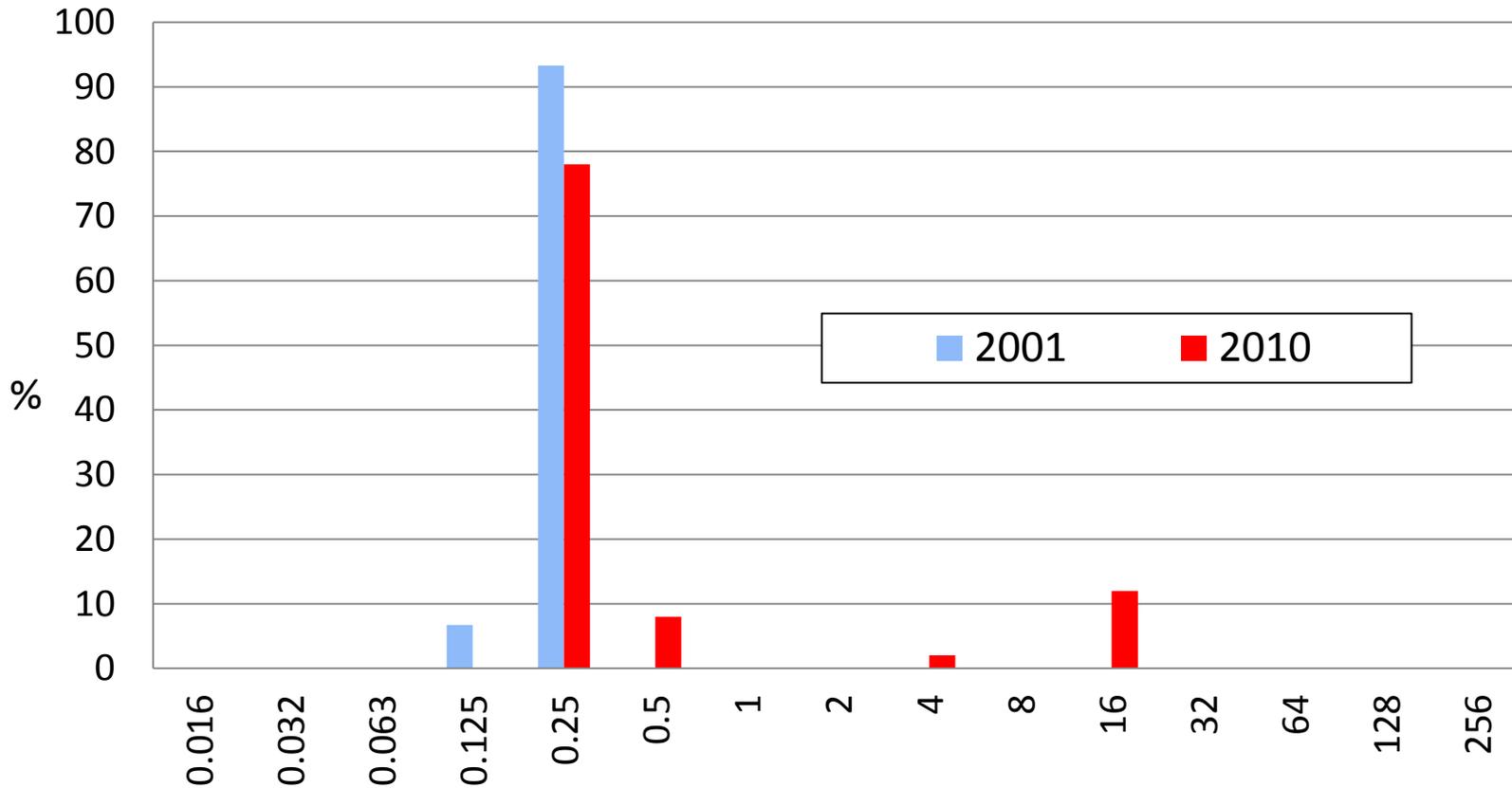


BP/MIC = 2

1 ml/10 kg
2 volte al giorno



4. Consente di MONITORARE L'ANDAMENTO DELLE RESISTENZE nel tempo e fornire al terapeuta report aggiornati



MATERIALI E METODI

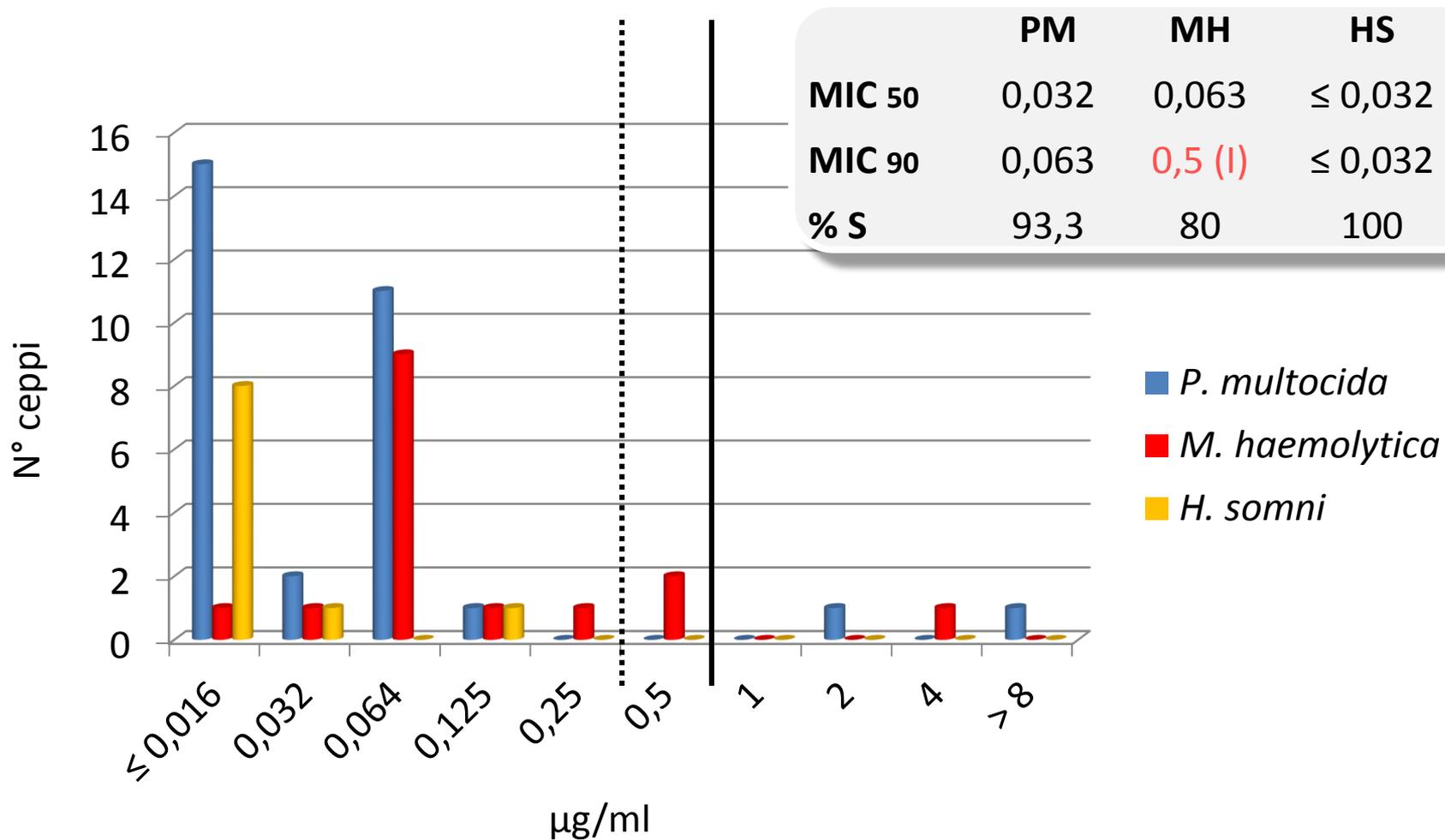
- ✓ 1 ceppo per specie microbica e per partita isolato da LBA
- ✓ 30 *P. multocida*, 15 *M. haemolytica*, 10 *H. somni*
- ✓ Metodo: microdiluizione in brodo (CLSI VET01-A4, 2013)
- ✓ Break-points: CLSI VET01-S2, 2013

✓ Molecole:

- Betalattamine: penicillina, amoxicillina, ceftiofur
- Aminoglicosidi: streptomicina
- Tetracicline: tetraciclina
- Macrolidi: tilmicosina
- Fluorchinolonici: enrofloxacin
- Amfenicoli: florfenicolo
- Sulfamidici: sulfametossazolo + trimethoprim

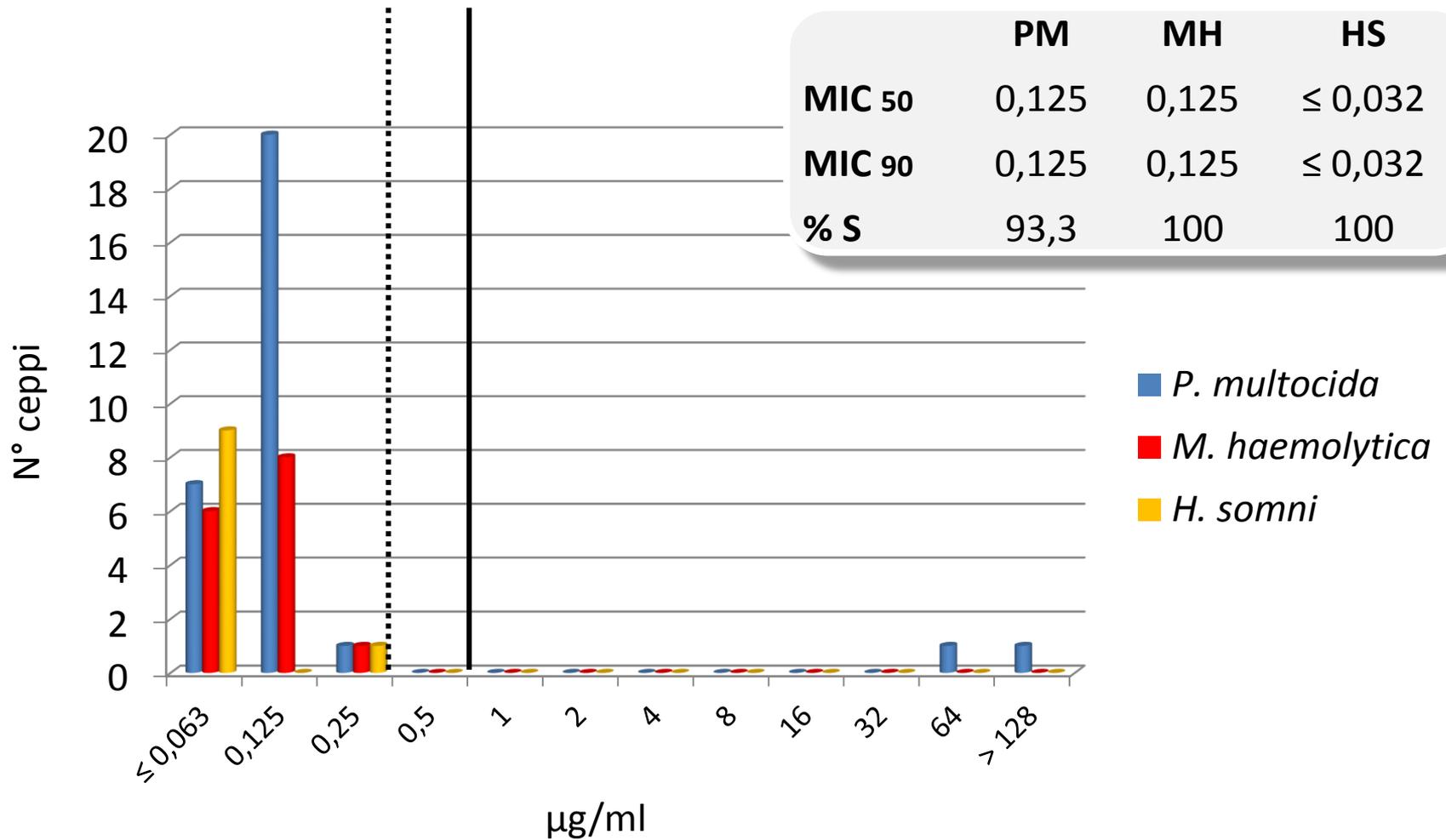
Penicillina

— Risultati (4) —



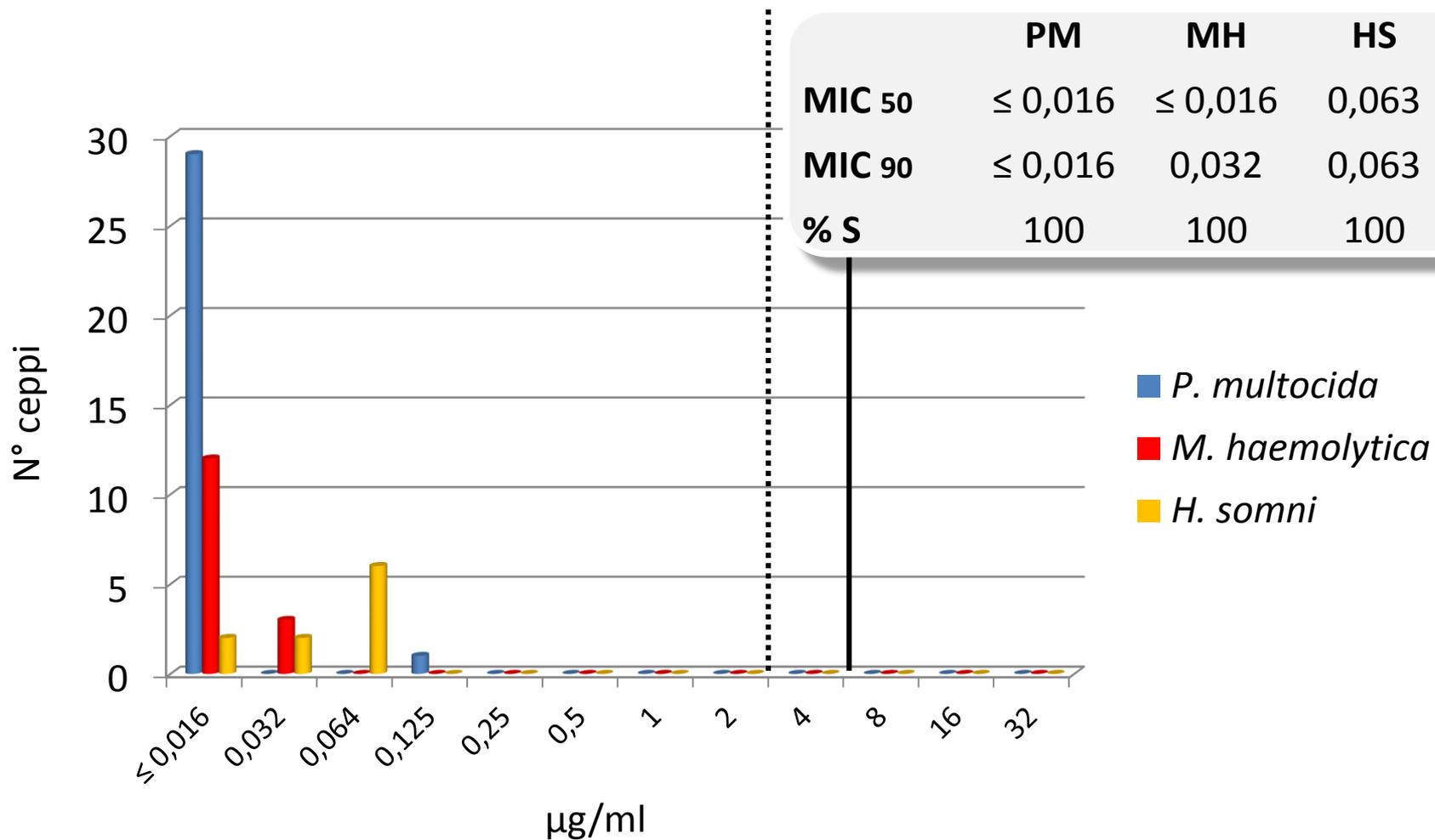
Amoxicillina

— Risultati (5) —



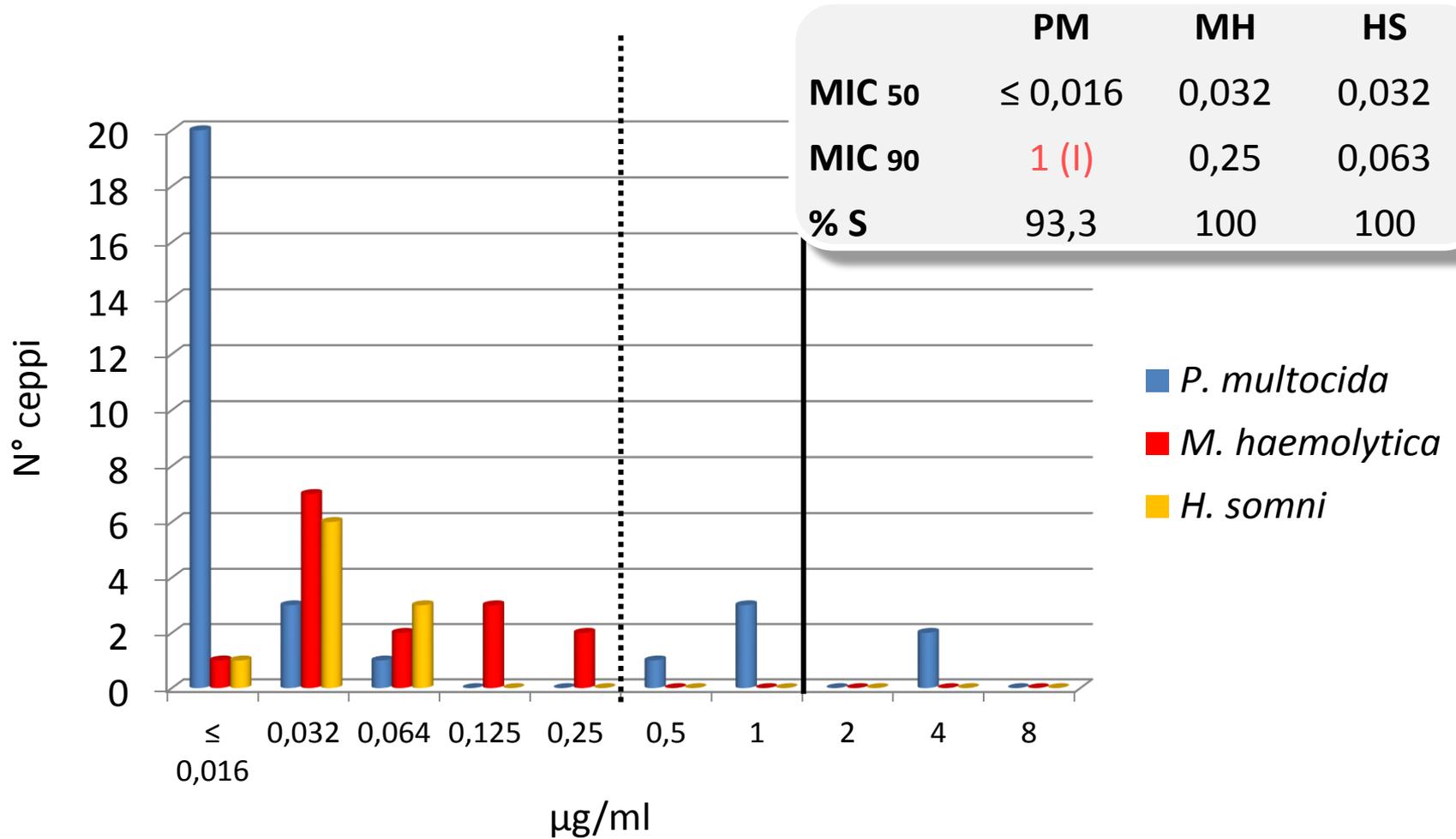
Ceftiofur

— Risultati (6) —



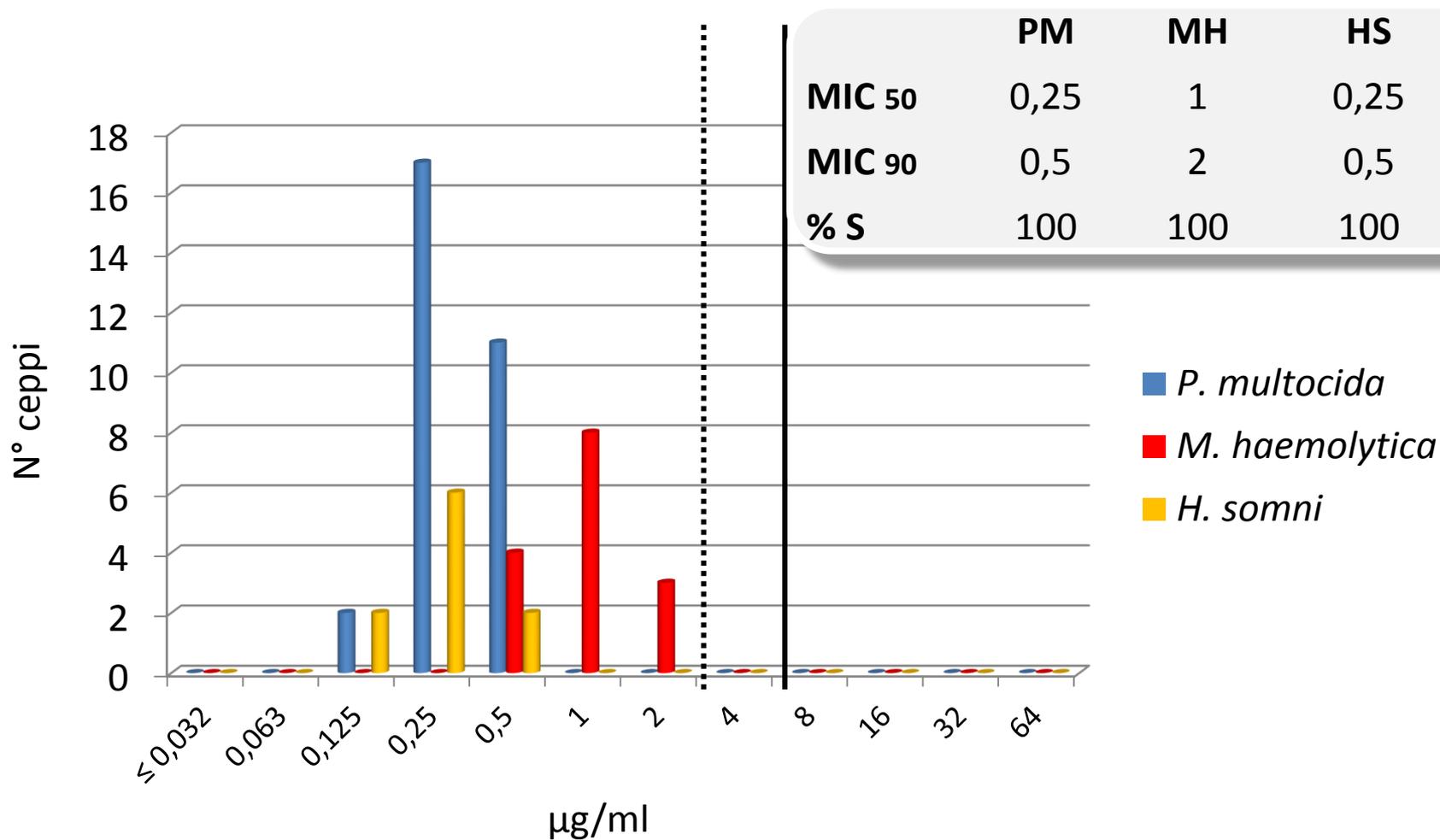
Enrofloxacin

— Risultati (7) —



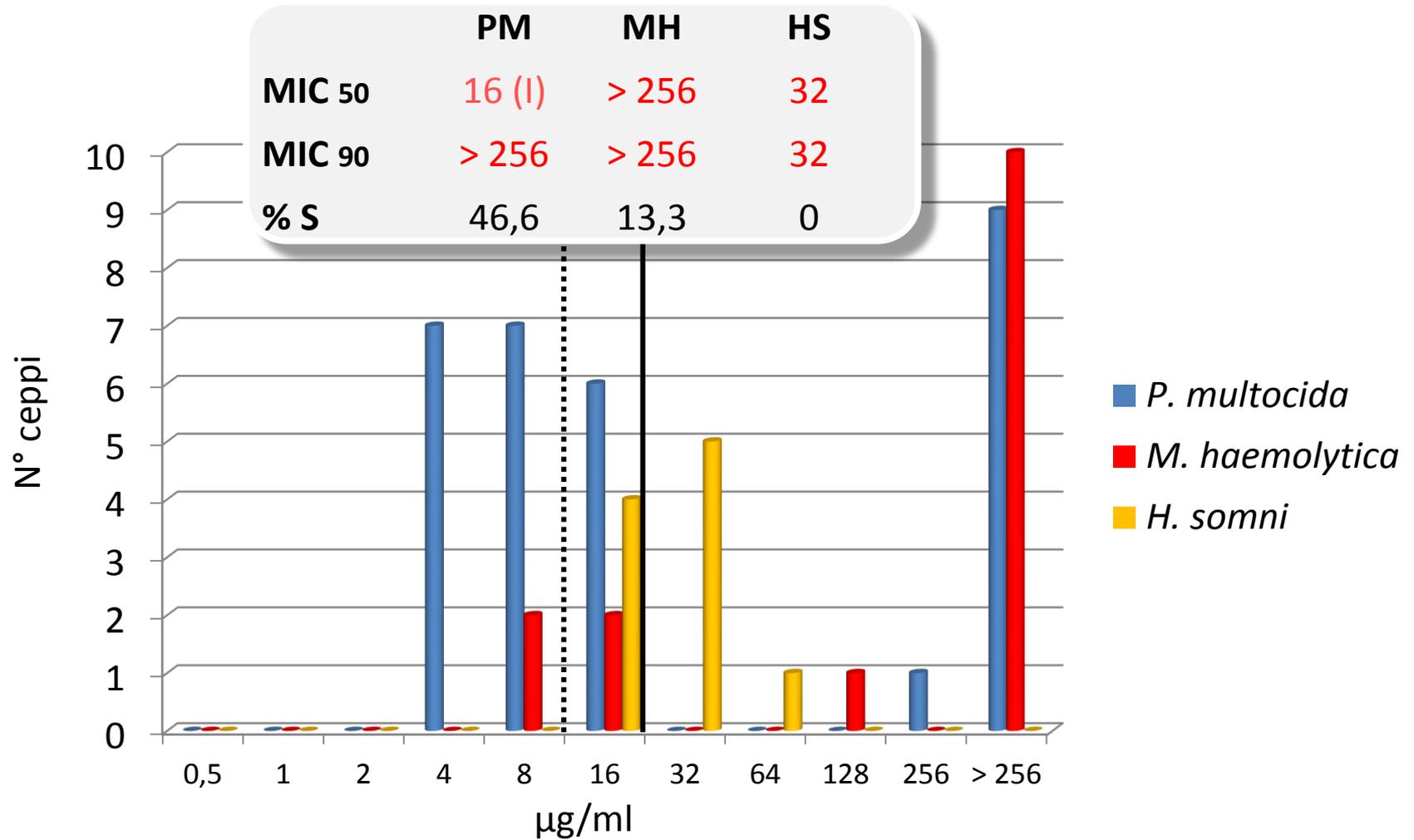
Florfenicol

— Risultati (8) —



Streptomicina

— Risultati (9) —



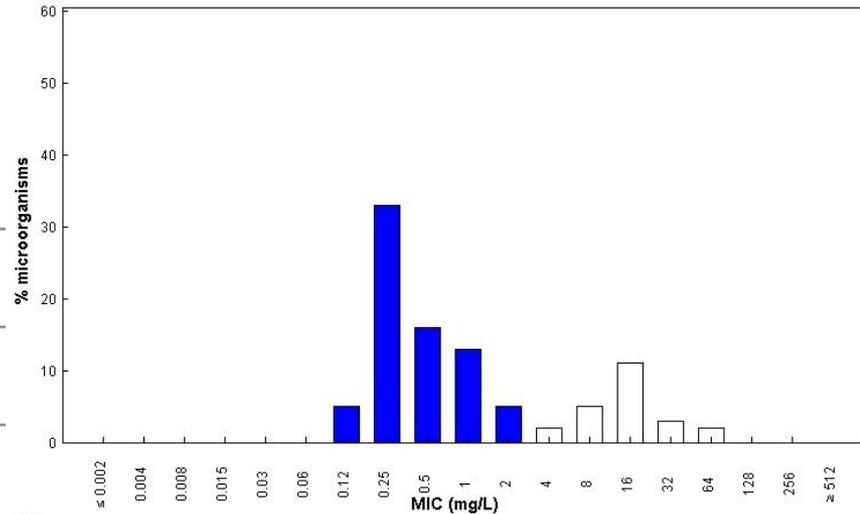
Tetraciclina

— Risultati (10) —

	PM	MH	HS
MIC 50	0,25	0,5	0,5
MIC 90	8	8	2
% S	70	86,6	90

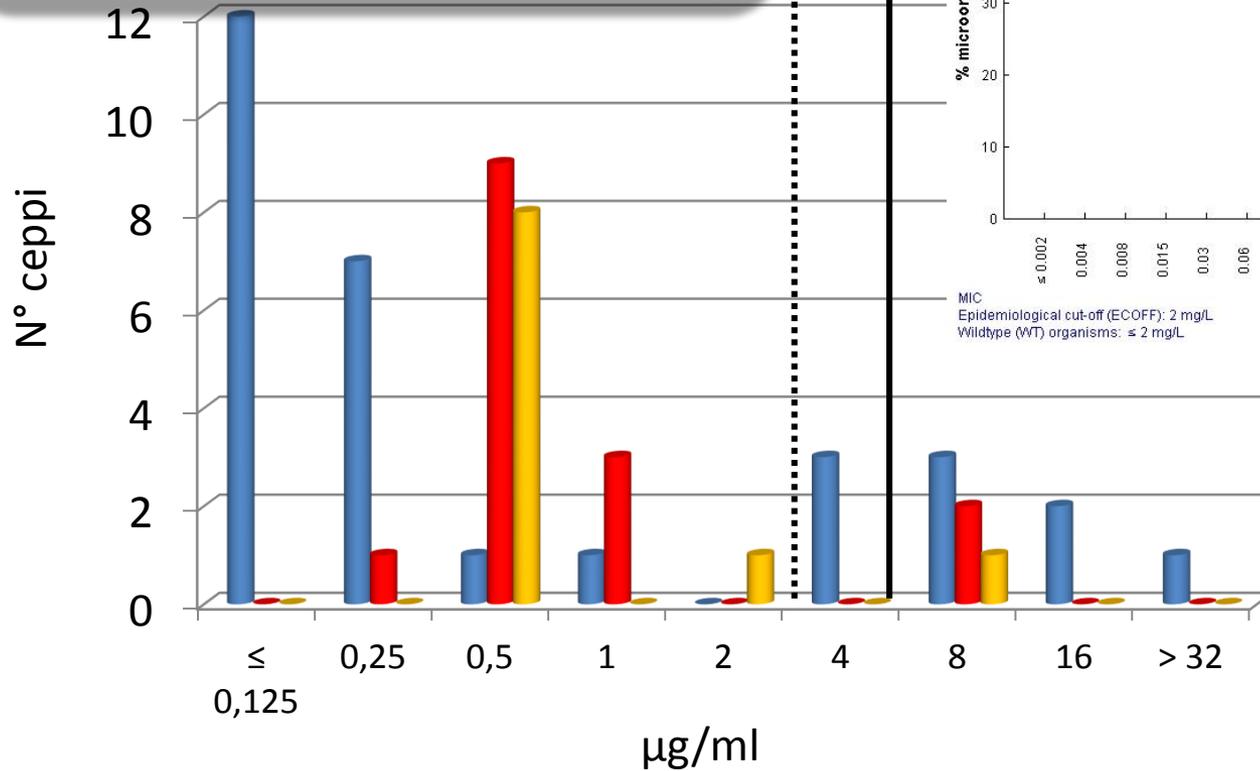
Tetracycline / *Pasteurella multocida*
International MIC Distribution - Reference Database 2015-11-10

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



MIC
Epidemiological cut-off (ECOFF): 2 mg/L
Wildtype (WT) organisms: ≤ 2 mg/L

336 observations (10 data sources)



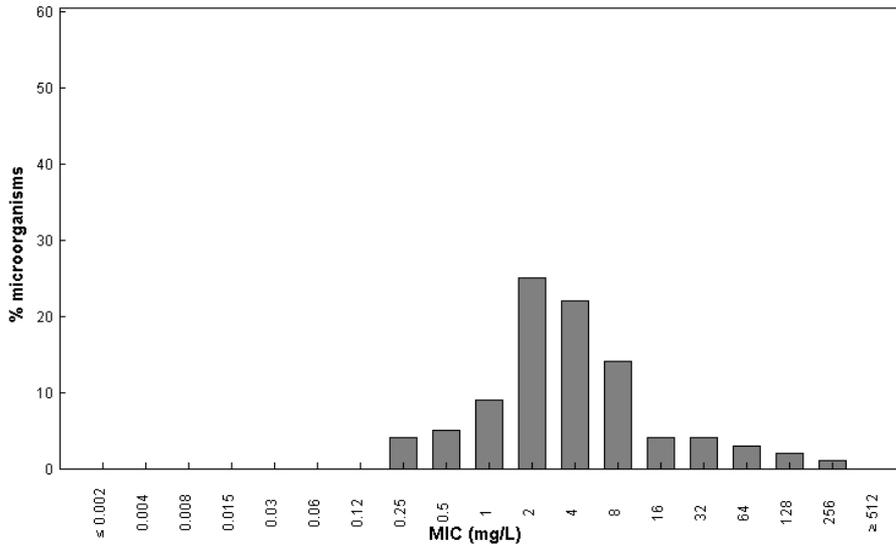
- *P. multocida*
- *M. haemolytica*
- *H. somni*

Tilmicosina

— Risultati (11) —

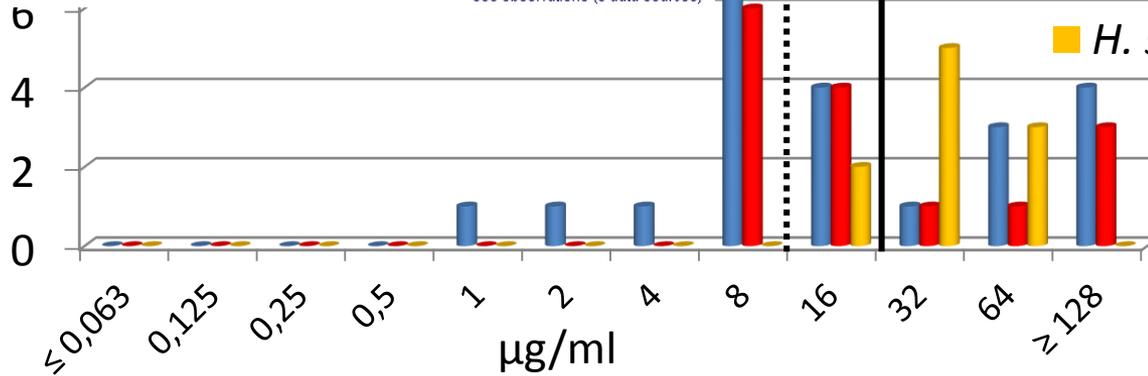
Tilmicosin / *Pasteurella multocida*
International MIC Distribution - Reference Database 2015-11-10

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



MIC Epidemiological cut-off (ECOFF): -
Wildtype (WT) organisms:

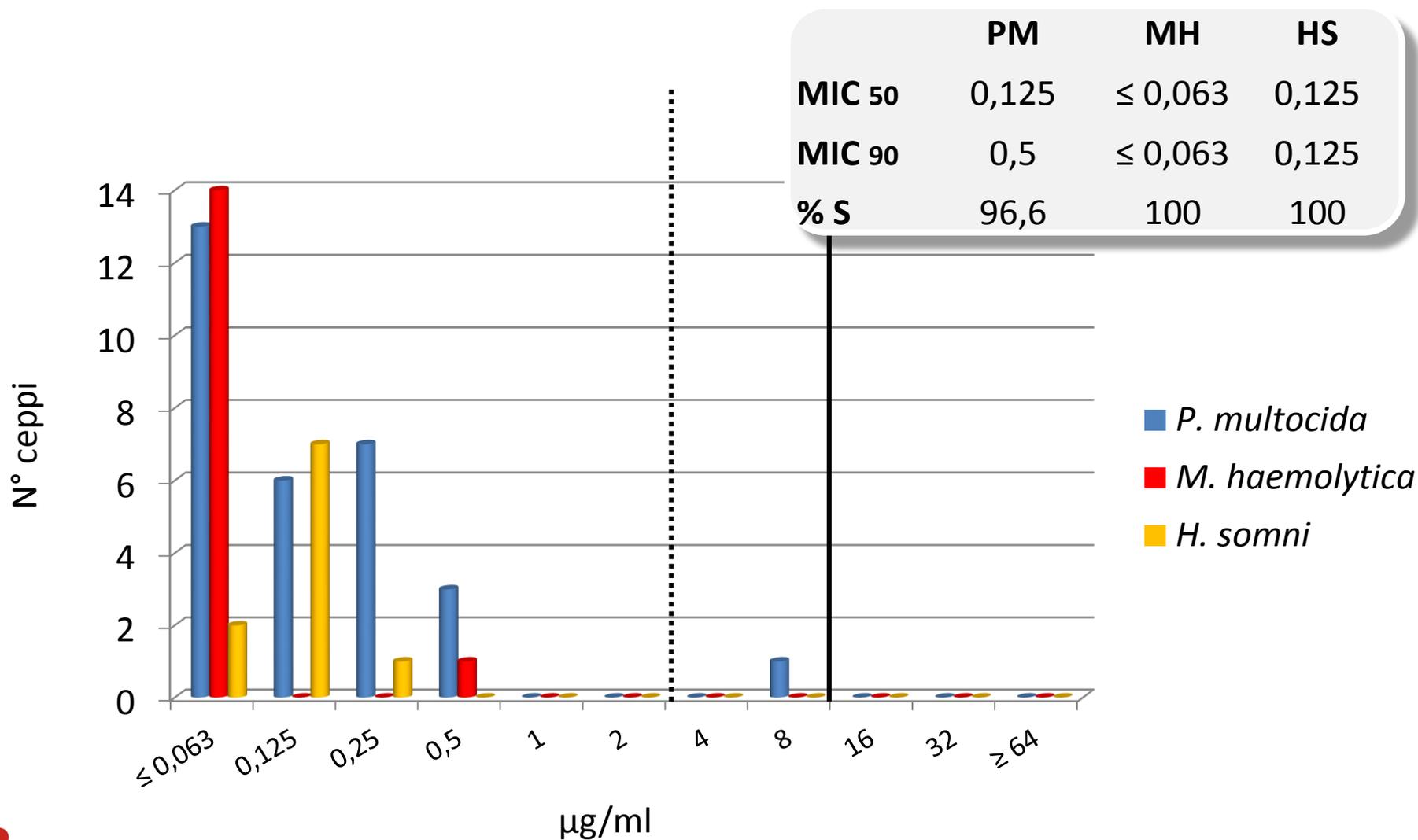
533 observations (6 data sources)



	PM	MH	HS
MIC 50	8	16	32
MIC 90	≥ 128	≥ 128	64
% S	60	40	0

Sulfametossazolo + Trimethoprim

— Risultati (12) —



**Nel 2017 la determinazione della MIC
in brodo diverrà il test di
farmacosensibilità di routine adottato
in IZSve per il settore buiatico**

La messa a punto dei pannelli

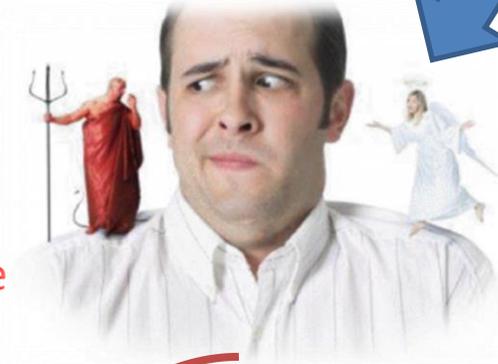
1. Scegliere molecole



- veterinari
- specialità registrate
- vari apparati e patologie

- per germi diversi
- per molecole diverse
- per apparati/patologie diverse

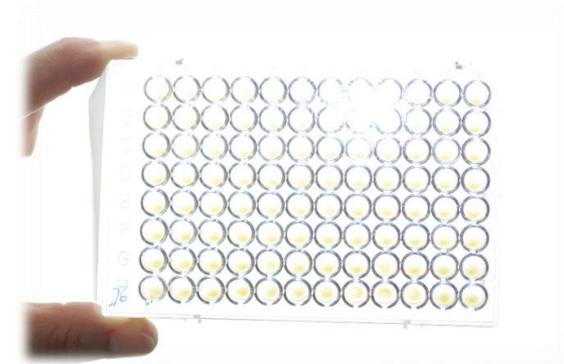
2. Individuare i break point ove non disponibili



3. Scegliere le diluizioni



- devono includere il BP
- possibilità di calcolare il BP/MIC
- possibilità di monitoraggio nel tempo



MIC in IZSVe: i pannelli disponibili nel 2017

- Gram – enterobatteriaceae: suino, coniglio, avicoli, **bovino**
- Gram- apparato respiratorio: suino, coniglio, avicoli, **bovino**
- Gram +/-anaerobi: suino, coniglio, avicoli, **bovino**
- Pannello PET (cane e gatto)
- Pannello mastiti
- Pannello pesci

Scelta delle molecole



DIREZIONE OPERATIVA DIAGNOSTICA GENERALE CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER L'ANTIBIOTICORESISTENZA

LINEE GUIDA PER L'INTERPRETAZIONE DELLE PROVE DI SENSIBILITÀ AI CHEMIOANTIBIOTICI *IN VITRO* PER UN UTILIZZO NELLA TERAPIA CLINICA.

I panel impiegati per le prove di sensibilità ai chemioantibiotici, gestite presso la Direzione Operativa Diagnostica Generale dell'IZSLT, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, sono composti di numerose molecole, alcune delle quali sono rappresentative di classi o subclassi di antibiotici ("class representative"), e pertanto definibili "molecole prototipo".

Le molecole prototipo, rappresentative per determinate classi e subclassi di chemioantibiotici, sono utilizzate per valutare la sensibilità dell'isolato anche nei confronti delle molecole rappresentate. La composizione di panel che comprendano almeno le "molecole prototipo" consente, con un numero ragionevole di test "in vitro", di saggiare un vasto range di classi e subclassi di chemioantibiotici, nei confronti di un determinato agente batterico per il quale possono avere indicazioni terapeutiche. Nella Tabella seguente è compreso un elenco delle molecole prototipo e delle relative molecole rappresentate.

Pannello patogeni respiratori

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	

Pannello Gram-negativi (enterobatteri)

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	

Pannello mastiti



Penicillin

Oxacillin

Amoxicillin + clavulanate

Cephalotin

Cefoperazone

Cefquinome

Enrofloxacin

Tetracycline

Eritromicina

Trimethoprim + sulfamethoxazole

Rifaximin

Lincomicina

Tiamfenicolo

Kanamicina

Pannello anaerobi e GRAM+

ANAEROBI

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	

FAC-SIMILE REFERTO

Nota MINSAL su impiego colistina (05/08/2016)

Oggetto: Uso responsabile dei medicinali veterinari contenenti colistina al fine di ridurre il rischio della resistenza antimicrobica

- impiego come ultima risorsa qualora nessun efficace trattamento alternativo sia disponibile;
- impiego unicamente sulla base di test di sensibilità;
- impiego conforme alle istruzioni riportate nel riassunto delle caratteristiche del prodotto;
- limitazione dell'uso in deroga di premiscele, anche in combinazione, in ragione delle conclusioni del CVMP secondo cui *“la valutazione rischi/benefici per i medicinali veterinari contenenti colistina in associazione con altri antimicrobici per somministrazione orale sia negativa e potrebbe costituire un potenziale rischio per la salute umana”*.

I riscontri di tale attività vanno comunicati all'indirizzo l.candela@sanita.it, come parte integrante della relazione sulle attività di controllo da trasmettere entro il 30 settembre di ogni anno.

Si ringrazia per la fattiva collaborazione e si resta a disposizione per qualsiasi eventuale chiarimento si rendesse necessario.

IL DIRETTORE GENERALE
(Dott. Silvio BORRELLO)





Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group

1. Reference testing of Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. is by the ISO-standard broth microdilution method (20776-1). Note:
 - a. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth is used
 - b. No additives may be included in any part of the testing process (in particular, no polysorbate-80 or other surfactants)
 - c. Trays must be made of plain polystyrene and not treated in any way before use
 - d. Sulphate salts of polymyxins must be used (the methanesulfonate derivative of colistin must not be used - it is an inactive pro-drug that breaks down slowly in solution)
2. Susceptibility testing by other methods, including agar dilution, disk diffusion and gradient diffusion, cannot be recommended until historical data have been reviewed or new study data have been generated. Work on these methods is ongoing.