

Linee guida per la corretta applicazione della MIC

(minima concentrazione inibente)





Linee guida per la corretta applicazione della MIC

A cura di: Fabrizio Agnoletti, Luca Bano, Antonio Barberio, Monia Cocchi, Marta Vascellari, Denis Vio, IZSve.

Progetto grafico: Laboratorio comunicazione della scienza, IZSve.

Foto: Ivan Volianskyi/Shutterstock.

Riproduzione vietata ai sensi di legge (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n° 633)
Copyright © 2021 Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

www.izsvenezie.it

Indice

L'antibioticoresistenza	4
La minima concentrazione inibente (MIC)	6
Cos'è la MIC	6
Il valore di MIC e la sua interpretazione	6
La scelta dei breakpoint per l'interpretazione dei risultati	7
Vantaggi della MIC	8
Come leggere e interpretare i rapporti di prova dei laboratori diagnostici di IZSVe	9
I nuovi pannelli IZSVe	10
Pannello per esaminare Enterobacteriaceae isolate da animali da reddito	10
Pannello per patogeni respiratori	11
Pannello per batteri Gram-positivi (aerobi) – animali da reddito	13
Pannello per agenti di mastite bovina	14
Pannelli per anaerobi	17
I pannelli dedicati agli animali d'affezione	19
I sistemi di reportistica utilizzati da IZSVe	23
Report pubblico	23
Report per utenti abilitati	23
Bibliografia	23

L'antibioticoresistenza

L'insorgenza spontanea di resistenza ad un antibiotico all'interno di una popolazione microbica è un evento naturale amplificato dall'esposizione di tale popolazione all'antibiotico in questione ("pressione selettiva"). La resistenza presente nella popolazione selezionata può essere trasmessa verticalmente nel corso della replicazione batterica oppure orizzontalmente, attraverso lo scambio di materiale genetico, possibile anche tra specie microbiche diverse.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS o WHO, World Health Organisation) ogni anno nel mondo muoiono 700 mila persone a causa di infezioni sostenute da batteri resistenti agli antibiotici. Per tale ragione, l'OMS ha classificato come critici (CIA, Critically Important Antimicrobials) alcuni principi attivi indispensabili per la cura di importanti infezioni umane, la cui efficacia terapeutica dev'essere preservata nel tempo. L'elenco degli antibiotici CIA è disponibile al link <https://www.who.int/foodsafety/publications/WHO-CIA-list-6flyer-EN.pdf?ua=1>. In tale documento gli antimicrobici CIA vengono suddivisi in: (i) principi attivi con il più alto grado di criticità (Highest Priority Critically Important Antimicrobials – HstPCIA) e (ii) antimicrobici ad alto grado di criticità (High Priority Critically Important Antimicrobials– HPCIA).

Dato che molte delle classi a cui appartengono gli antibiotici sono utilizzate sia in medicina umana che veterinaria, la comunità scientifica è concorde nel ritenere che la difesa dell'efficacia di tali molecole, e più in generale la lotta all'antibioticoresistenza, sia possibile solo attraverso uno sforzo collettivo trasversale in un'ottica "One Health".

Secondo la logica *One Health*, quindi, per cercare di preservare nel tempo l'efficacia degli antimicrobici, ed in particolare dei CIA, dovrà esserci un intervento unitario e sinergico nei confronti delle pratiche di utilizzo e gestione degli antimicrobici adottate sia ambito umano, che animale ed ambientale.

A dicembre 2019, l'Agenzia Europea del Farmaco (EMA), su richiesta della Commissione Europea, ha emanato un documento (https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf) nel quale, dal punto di vista del possibile impiego veterinario, gli antimicrobici vengono suddivisi in quattro categorie:

- A (*avoidance*): include gli antibiotici da non utilizzare per la terapia delle patologie animali.
- B (*restricted*): include gli antibiotici da usare solo quando gli antibiotici di categoria D e C risultano clinicamente non efficaci;
- C (*caution*): include gli antibiotici da usare quando gli antibiotici di categoria D risultano clinicamente non efficaci;
- D (*prudence*): include gli antibiotici da usare come prima scelta

Alla categoria A (avoidance) appartengono antibiotici non autorizzati come medicinali veterinari nell'Unione Europea, utilizzabili solo in circostanze eccezionali e solo per la terapia individuale di animali da compagnia. In questo contesto si rimanda alle linee guida sull'uso prudente degli antibiotici negli animali da compagnia, secondo le quali gli antibiotici CIA non vanno impiegati come prima scelta in medicina veterinaria, a meno che il veterinario non abbia valutato, sulla base di test di sensibilità antimicrobica e di adeguate informazioni epidemiologiche, che rappresentano l'unica opzione (<https://www.alimenti-salute.it/sites/default/files/Linee%20Guida%20PETs%202018.pdf>).

La descrizione dettagliata della classificazione proposta dall'EMA e degli antibiotici inclusi in ogni categoria è consultabile al sito: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/advice-impacts-using-antimicrobials-animals>.

Inoltre, alcuni paesi europei tra cui l'Italia, hanno deciso di adottare linee guida per l'uso razionale (o "prudent use") degli antibiotici in medicina veterinaria. Tali linee guida, tra le altre azioni, suggeriscono di limitare l'utilizzo di farmaci CIA solo a quelle situazioni in cui un test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici abbia evidenziato l'inefficacia di molecole di prima scelta "non-CIA". Indicazioni in tal senso sono state ribadite anche da una nota esplicativa del Ministero della Salute (<https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2019&codLeg=67719&parte=1&serie=>).

I laboratori diagnostici veterinari hanno pertanto la responsabilità di mettere a disposizione del veterinario che opera negli ambulatori o nelle cliniche veterinarie, servizi diagnostici per la valutazione in vitro dell'efficacia antibatterica degli antibiotici, mirati a promuoverne l'uso razionale.

La minima concentrazione inibente (MIC)

Cos'è la MIC

La minima concentrazione inibente (MIC) è la più bassa concentrazione di un antibiotico in grado di inibire visibilmente la crescita batterica *in vitro*. È pertanto un dato quantitativo, generalmente espresso in $\mu\text{g/mL}$ (o mg/L) che si ricava mettendo in contatto il microrganismo in esame con diluizioni scalari di un antibiotico, contenute in un terreno colturale solido (MIC in agar) o liquido (MIC in brodo). La determinazione della MIC è uno dei test a disposizione del laboratorio di microbiologia clinica per saggiare la sensibilità agli antibiotici di un ceppo batterico precedentemente isolato da un animale malato. Questo test non viene eseguito nei confronti dei principi attivi verso i quali il microrganismo in esame ha una resistenza innata (cosiddetta "resistenza intrinseca").

La determinazione della MIC in agar, sebbene applicabile a qualunque specie microbica, non può essere utilizzata nella routine diagnostica a causa della sua complessità tecnica e della scarsa possibilità di automazione, e trova applicazione solo in attività di studio e ricerca.

Nei laboratori diagnostici di IZS^{Ve}, viene quindi utilizzato il metodo della microdiluizione in brodo, che impiega piastre monouso a 96 pozzetti, contenenti diluizioni scalari dei diversi principi attivi saggiati.

Il valore di MIC e la sua interpretazione

La posologia di un antimicrobico è definita in base alla sua capacità di raggiungere concentrazioni pari o superiori alla MIC nel sito target ed in base al tempo necessario ad esercitare l'azione battericida o batteriostatica. Il valore di MIC non è in nessun modo correlabile al dosaggio o alle modalità di somministrazione di un antimicrobico all'animale; queste ultime dovranno sempre attenersi alle indicazioni del foglietto illustrativo della specialità veterinaria prescritta.

Nei rapporti di prova dei laboratori diagnostici di IZS^{Ve} il microrganismo in esame viene definito Sensibile (S), Intermedio (I) o Resistente (R) nei confronti degli antibiotici considerati.

Queste definizioni rappresentano un'indicazione di probabilità di successo terapeutico, così come definito dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019):

- S: Sensibile, a regime standard di dosaggio: un microrganismo è classificato come "S", quando esiste un'elevata probabilità di successo terapeutico utilizzando un regime di dosaggio standard dell'antibiotico.

- I: Sensibile, esposizione in incremento: un microrganismo è categorizzato come "I" quando c'è una alta probabilità di successo terapeutico poiché l'esposizione all'antibiotico è aumentata grazie all'aggiustamento della dose o della concentrazione nel sito di infezione.
- R: Resistente: un microrganismo è classificato come "R" quando esiste un'elevata probabilità di fallimento terapeutico, anche in presenza di un'aumentata esposizione.

Una corretta archiviazione ed elaborazione dei dati di MIC, inoltre, consente di monitorare l'andamento delle sensibilità agli antimicrobici nel tempo ed evidenziare l'insorgenza di eventuali cluster di resistenza.

La distribuzione dei valori di MIC di un antimicrobico ottenuta studiando un gruppo di ceppi appartenenti alla stessa specie microbica, potrebbe inoltre consentire di individuare dei cut-off epidemiologici attraverso i quali distinguere ceppi wild type, che verosimilmente non sono mai entrati in contatto con l'antimicrobico in questione, da ceppi non-wild type, nei quali si è selezionata resistenza microbiologica in seguito al contatto con l'antimicrobico.

La scelta dei breakpoint per l'interpretazione dei risultati

La probabilità di successo terapeutico di un antibiotico nei confronti del microrganismo in esame viene espressa con le definizioni di Sensibile, Intermedio o Resistente, come precedentemente illustrato. Per classificare in questo modo i risultati delle MIC è necessario adottare come criterio interpretativo specifiche concentrazioni soglia dell'antibiotico, comunemente denominate con il termine inglese "breakpoint" (BP). La scelta dei BP è quindi cruciale per una corretta classificazione dei risultati ottenuti nel test.

I BP utilizzati per classificare l'efficacia in vitro degli antibiotici impiegati da IZSVE, sono stati desunti, quando possibile, dalle linee guida delle seguenti organizzazioni internazionali, che garantiscono una robusta analisi statistica: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).

Se disponibili, sono stati adottati i BP specifici per la specie animale considerata, ma questo purtroppo è stato possibile farlo solo in un numero limitato di casi. Di norma, quando il dato per la singola specie animale non era disponibile, è stato utilizzato il BP riferito ad altra specie animale, o, mancando anche questo dato, quello riferito all'uomo. In alcuni casi sono stati utilizzati come fonte di BP i risultati di ricerche pubblicate in riviste scientifiche indicizzate di provata serietà o, in mancanza di altre fonti, cut-off epidemiologici derivanti dall'attività analitica o di ricerca svolta dai laboratori IZSVE.

Nel caso in cui non siano disponibili BP sufficientemente validati per interpretare il risultato della MIC (es. per rettili, anfibi, alcune specie di uccelli ornamentali o per alcune specie batteriche), la MIC potrà essere determinata ugualmente dal laboratorio, in accordo col veterinario curante, e il rapporto di prova verrà emesso senza alcuna interpretazione. In questi casi, come già riportato nel capitolo precedente, il veterinario curante potrà combinare il dato di MIC con informazioni di farmacocinetica e di tossicità eventualmente disponibili in letteratura per effettuare la scelta terapeutica.

Maggiori dettagli su BP e fonti bibliografiche dei BP utilizzati per l'interpretazione dei risultati dei pannelli MIC di IZSVe sono consultabili al seguente link: <https://www.izsvenezie.it/temi/altri-temi/antibiotico-resistenza-sensibilita/fonti-breakpoint-mic/>.

Vantaggi della MIC

La MIC rappresenta una misura quantitativa dell'attività di un antibiotico verso un determinato isolato batterico. Essa, infatti, è la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce la crescita batterica in vitro.

Il valore di MIC, interpretato mediante specifici BP e quindi categorizzato come Sensibile, Intermedio o Resistente, fornisce indicazioni in merito all'efficacia terapeutica attesa. Il dato, opportunamente catalogato ed elaborato, consente di monitorare l'andamento delle sensibilità nel tempo, evidenziando l'insorgenza di eventuali cluster di resistenza. Nel rapporto di prova emesso da IZSVe, inoltre, è stato inserito un ulteriore criterio interpretativo: il quoziente BQ, indicato nel rapporto di prova con la dizione "quoziente". Il quoziente BQ esprime il rapporto tra il valore del BP di sensibilità utilizzato per l'interpretazione e il valore di MIC rilevato. Questo dato normalizza i risultati e rende comparabile l'attività inibente delle varie molecole saggiate permettendo quindi una maggiore e rapida lettura del referto. Tanto più alto è il valore del quoziente BQ, tanto maggiore sarà il margine di sicurezza terapeutica; in altre parole, tanto più alto è il quoziente BP tanto minore sarà la probabilità che il microrganismo sviluppi resistenza clinica in corso di terapia.

Infine, il valore di MIC può essere utilizzato per selezionare l'antibiotico più appropriato anche in assenza di specifici BP clinici. In questo caso il valore può essere confrontato con la concentrazione di antibiotico raggiunta "in vivo" dal farmaco prescelto. Dal punto di vista pratico, ove possibile, è consigliato impiegare prodotti farmaceutici che raggiungano una concentrazione pari ad almeno 3 volte la concentrazione minima inibente la crescita batterica "in vitro"; questo ovviamente senza dimenticare la necessità di rispettare le indicazioni del foglietto illustrativo.

Come leggere e interpretare i rapporti di prova dei laboratori diagnostici di IZSve

Elenco dei principi attivi saggiati

Interpretazione della MIC, in base al breakpoint utilizzato

Range delle diluizioni di antimicrobico saggiate. Si tratta di diluizioni scalari a base 2.

Sigla del riferimento bibliografico del breakpoint. La voce bibliografica completa è disponibile nel sito dell'IZSve

MATERIALE: CEPPLO BATTERICO (POLLO INGRASSO)					
ANALISI DERIVATA / CAMPIONE CONOSCIUTO					
ANALISI (Metodo)	Campione		Risultato		
DETERMINAZIONE DELLA MIC DI ENTEROBATTERIACEAE E DI GRAM NEGATIVI (MICRODILUZIONE IN BRODO / PDP DIA 149 Rev. 01)		23 - 4 ESCHERICHIA COLI derivato da SACCO VITELLINO - 24			
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	Range (µg/mL)	Fonte BP
Ampicillina	1	Sensibile	8	0,0625-32	CLSI-H
Apramicina	2	Sensibile	8	0,25-64	TI-HO BAKUM
Colistina	0,125	Sensibile	16	0,015625-8	EUCAST, SFM
Enrofloxacin	0,03125	Sensibile	8	0,015625-32	CLSI-V
Florfenicolo	4	Sensibile	2	1-64	CLSI-V (S. choleraesuis)
Flumequina	<0,25	Sensibile	>16	0,25-32	SFM
Gentamicina	0,25	Sensibile	16	0,0625-32	CLSI-H
Aminosidina	2	Sensibile	4	0,125-32	SFM (BP per Kanamicina)
Tetraciclina	1	Sensibile	4	0,03125-16	CLSI-H
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,0625/ 1,1875	Sensibile	>32	0,0625/1,1875- 16/304	CLSI-H

Legenda
BP = Breakpoint. Per le fonti dei BP si prega di consultare l'apposita pagina sul sito www.izsvenezie.it

Valore di MIC rilevato. I valori preceduti dai segni > o < indicano MIC rispettivamente maggiori e minori delle concentrazioni massima e minima di principio attivo saggiate nel test.

Quoziente tra il BP di sensibilità e la MIC ottenuta. Tale valore (BQ) consente di normalizzare i valori delle MIC dei principi attivi saggiati, permettendone una comparazione. Qualora i BP utilizzati fossero clinici e *robusti* per la combinazione specie animale/malattia/specie batterica/antimicrobico, il principio attivo con il BQ più elevato potrà essere ritenuto il più promettente per raggiungere il successo terapeutico. Questa valutazione, tuttavia, andrà sempre affiancata ad altre attinenti l'uso prudente del farmaco.

I nuovi pannelli IZSVe

IZSVe ha predisposto alcuni pannelli di antibiotici, selezionando i principi attivi utilizzati in base ai microrganismi target e tenendo conto delle specialità veterinarie registrate nelle varie specie animali. Per principi attivi appartenenti alla stessa famiglia di antimicrobici, sono state preferite le molecole definite “prototipo” dal centro di riferimento nazionale per l’antibioticoresistenza (CRAB) (<https://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2021/03/Molecole-prototipo-e-loro-equivalenti-in-vitro.pdf>). Si ricorda che, secondo le indicazioni del CRAB, le molecole prototipo possono essere utilizzate per valutare la sensibilità del microrganismo in esame anche nei confronti degli altri principi attivi afferenti alla medesima famiglia. Inoltre, ove possibile, si è cercato di preferire i principi attivi per i quali sono disponibili BP clinici “robusti”, forniti da laboratori di riferimento internazionalmente riconosciuti (CLSI, EUCAST).

I pannelli IZSVe predisposti per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici sono:

- Pannello per Enterobacteriaceae – animali da reddito
- Pannello per patogeni respiratori – animali da reddito
- Pannello per batteri Gram-positivi (aerobi) – animali da reddito
- Pannello per agenti di mastite bovina
- Pannelli per anaerobi – animali da reddito (un pannello generico e uno dedicato a *Brachyspira hyodysenteriae*)
- Pannello per batteri Gram-positivi - animali da compagnia
- Pannello per batteri Gram-negativi - animali da compagnia

Pannello per esaminare Enterobacteriaceae isolate da animali da reddito

Le Enterobacteriaceae sono batteri Gram-negativi, responsabili di molteplici patologie nell’uomo e negli animali. Questo pannello è dedicato a saggiare la sensibilità delle Enterobacteriaceae clinicamente rilevanti, isolate nel corso di patologie a carico di vari apparati. Per i batteri Gram-negativi afferenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae e responsabili di mastite bovina si farà ricorso al pannello per agenti di mastite bovina. Nel caso della famiglia degli aminoglicosidi, non esiste un’unica molecola rappresentativa di tutte quelle registrate perciò nel pannello sono state incluse aminosidina, kanamicina e gentamicina.

Nel caso in cui il microrganismo sottoposto al test di MIC sia una *Salmonella*, sia EUCAST (www.eucast.org) che CLSI (M 100, Enterobacteriales) considerano non attendibili le sensibilità agli aminoglicosidi; per tale ragione nei test eseguiti per valutare la sensibilità agli antimicrobici di batteri appartenenti al genere *Salmonella* le MIC degli aminoglicosidi non verranno refertate.

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Flumequina	X		
Amoxicillina/Acido clavulanico		X	
Ampicillina		X	Amoxicillina, Etacillina
Cefazolina			
Cefotaxime	X		Ceftiofur, Cefoperazone, Cefpodoxime, Cefquinome
Sulfisoxazolo			Tutti i sulfamidici
Colistina	X		
Enrofloxacin	X		Enrofloxacin, Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin
Florfenicolo			
Gentamicina		X	Apramicina
Tetraciclina			Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina
Trimetoprim/Sulfametossazolo			Sulfamidici potenziati con Trimethoprim
Aminosidina		X	
Kanamicina		X	Neomicina

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Pannello per patogeni respiratori

Le patologie respiratorie negli animali da reddito sono causate da patogeni batterici diversi, in alcuni casi specie-specifici.

Anche per questo pannello, nella scelta delle molecole che lo compongono, si è tenuto conto delle specialità registrate nelle varie specie animali e, per molecole della stessa famiglia, delle molecole considerate "prototipo" secondo quanto riportato dal centro di referenza per l'antibiotico-resistenza (<https://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2021/03/Molecole-prototipo-e-loro-equivalenti-in-vitro.pdf>).

Per la famiglia dei macrolidi è stata operata la scelta di inserire nel pannello i farmaci più frequentemente utilizzati nelle specie da reddito; tra questi vi sono anche principi attivi recenti che dispongono di BP definiti dal CLSI nelle specie animali e per le patologie per le quali sono registrati.

Nel pannello sono presenti molecole considerate HstPCIA (cefotaxime, flumequina, enrofloxacin, gamitromicina, tulatromicina, tildipirosina e tilmicosina) che dovrebbero essere prescritte solo se registrate in quella specie animale per quella patologia, e qualora il test di antibioticosensibilità abbia evidenziato resistenze verso i principi attivi di prima scelta.

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Flumequina		X	
Amoxicillina/Acido clavulanico		X	
Ampicillina		X	Amoxicillina, Etacillina
Ceftiofur	X		Cefoperazone, Cefpodoxime, Cefquinome
Enrofloxacin	X		Danofloxacin, Ciprofloxacina, Marbofloxacina, Orbifloxacin, Pradofloxacina
Florfenicolo			
Kanamicina		X	Neomicina
Spectinomycin		X	
Tetraciclina			Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina
Tiamulina			
Trimethoprim/Sulfamidici			Sulfamidici potenziati con Trimethoprim
Gamitromicina	X		
Tildipirosina	X		
Tilmicosina	X		Spiramicina, Tilosina (Solo per Pasteurellaceae, e. g. <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> nei ruminanti)
Tulatromicina	X		

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Pannello per batteri Gram-positivi (aerobi) – animali da reddito

Questo pannello è dedicato agli antibiotici da impiegare per il trattamento delle infezioni degli animali da reddito sostenute da batteri Gram-positivi aerobi. Questo pannello verrà impiegato anche per i germi isolati da casi di mastite degli ovicaprini. Gli antibiotici inclusi nel pannello comprendono principalmente beta-lattamici, cefalosporine, macrolidi e tetracicline. Sono stati inclusi anche alcuni antibiotici a spettro allargato, nel caso ci si debba confrontare con infezioni miste, ma si ritiene opportuno rammentare che l'impiego di prodotti ad ampio spettro va limitato alle situazioni di oggettiva necessità. Considerato il potenziale impiego del pannello per gli agenti di mastite ovicaprina, sono stati inseriti anche due antibiotici efficaci solo nei confronti di batteri Gram-negativi: sulfisoxazolo e kanamicina, che non vanno considerati per la terapia di batteri Gram-positivi.

Anche per questo pannello per la scelta dei principi attivi che lo compongono si è tenuto conto delle specialità registrate nelle varie specie e, per molecole della stessa famiglia, delle molecole considerate "prototipo". Con questo termine s'identificano alcuni antibiotici che fungono da marker per predire la resistenza o la sensibilità di altri antibiotici appartenenti alla stessa classe. Di seguito sono sintetizzati i principali antibiotici marker e le loro capacità predittive nei confronti di altri antibiotici.

La maggior parte degli antibiotici prototipo presenti nel pannello sono comuni a quelli inseriti nel pannello mastite, per cui si rimanda alla descrizione presente in quel pannello; di seguito sono illustrati solo gli antibiotici prototipo non inclusi nel pannello mastite.

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Amoxicillina/Acido clavulanico		X	
Ampicillina		X	Amoxicillina, etacillina
Penicillina		X	Penetamato
Oxacillina			Oxacillina, Meticillina, Cloxacillina, Flucoxacillina, Nafcillina
Cefazolina			Tutte le Cefalosporine di I° generazione: Cefalotina, Cefadroxil, Cefalexina, Cefapirina, Cefradina, Cefaclor, Cefacetrile, Cefalonio
Ceftiofur	X		Cefoperazone, Cefpodoxime, Cefquinome

Enrofloxacin	X	Enrofloxacin, Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin
Eritromicina	X	Eritromicina, Tulathromicina, Gamithromicina, Tilosina (per <i>Staphylococcus</i> spp.)
Clindamicina		Lincomicina
Kanamicina		X
Tilmicosina	X	
Sulfisoxazolo		Tutti i sulfamidici
Trimethoprim/Sulfamidici		Sulfamidici potenziati con Trimethoprim
Florfenicolo		
Tetraciclina		Clortetraciclina, Ossitetraciclina
Rifampicina/rifaximina		Rifamicine (Rifampicina, Rifaximina)

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Note specifiche

L'impiego terapeutico degli aminoglicosidi associati alle penicilline per il trattamento degli Enterococchi può risultare efficace solo se questi batteri non presentano elevate caratteristiche di resistenza agli aminoglicosidi. A questo fine nel pannello MIC sono stati inseriti due pozzetti con alta concentrazione di kanamicina: pertanto i pozzetti ad elevata concentrazione di kanamicina (250 e 500 µg/mL) vanno considerati solo per le MIC degli Enterococchi. La valutazione di sensibilità o resistenza viene comunque già calcolata automaticamente dal sistema esperto che genera il rapporto di prova. Le molecole del pannello classificate come HstPCIA e/o categoria B (restricted) da EMA vanno prescritte solo quando le altre molecole non incluse in queste categorie risultano clinicamente non efficaci sulla base dei risultati del test di antibioticosensibilità.

Pannello per agenti di mastite bovina

Il pannello per gli agenti di mastite è dedicato interamente agli antibiotici da impiegare per il trattamento dei casi di mastite bovina. Nel caso d'impiego di questo pannello per la mastite degli ovicaprini va considerato che alcuni BP sono stati definiti in modo specifico per la specie bovina.

Anche per questo pannello nella scelta delle molecole si è tenuto conto delle specialità registrate nelle varie specie animali e, per molecole della stessa famiglia, delle molecole considerate “prototipo”. Con questo termine s’identificano alcuni antibiotici che fungono da marker per predire la resistenza o la sensibilità di altri antibiotici appartenenti alla stessa classe. Di seguito sono sintetizzate i principali antibiotici marker usati e le loro capacità predittive nei confronti di altri antibiotici.

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Amoxicillina/Acido clavulanico		X	
Ampicillina		X	Amoxicillina, etacillina
Penicillina		X	Penetamato
Oxacillina			Oxacillina, Meticillina, Cloxacillina, Flucoxacillina, Nafcillina
Cefazolina			Tutte le Cefalosporine di I° generazione: Cefalotina, Cefadroxil, Cefalexina, Cefapirina, Cefradina, Cefaclor, Cefacetrile, Cefalonio
Ceftiofur	X		Cefoperazone, Cefpodoxime, Cefquinome (per ESBL produttori)
Cefquinome	X		
Enrofloxacin	X		Enrofloxacin, Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin
Eritromicina	X		Eritromicina, Tulathromicina, Gamithromicina, Tilosina (per Staphylococcus spp.)
Gentamicina		X	Tobramicina, Apramicina
Kanamicina		X	
Trimethoprim/Sulfamidici			Sulfamidici potenziati con Trimethoprim
Pirlimicina			Clindamicina, Lincomicina
Rifampicina/rifaximina			Rifamicine (Rifampicina, Rifaximina)

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull’antibiotico-resistenza

Note specifiche

Oxacillina: è predittiva per la sensibilità alle altre penicilline antistafilococciche (cloxacillina, dicloxacillina). Nel caso di *Staphylococcus aureus* la resistenza all'oxacillina è indicativa della presenza di un potenziale ceppo meticillino-resistente (MRSA). Gli MRSA sono resistenti a tutti gli antibiotici appartenenti al gruppo dei beta-lattamici, cefalosporine incluse, e possono rappresentare un serio rischio per la salute umana in caso di trasmissione dall'animale all'uomo. La conferma dei ceppi MRSA viene effettuata dal laboratorio con test molecolari specifici.

Le cefalosporine di III e IV generazione non consentono di predire con una molecola prototipo la sensibilità ad entrambi i gruppi, per cui è stata inserita una cefalosporina di III generazione, il ceftiofur, e una di IV generazione, il ceftinome. Si rammenta che le cefalosporine di III e IV generazione sono classificate come HPCIA da OMS/WHO e come antibiotici di categoria B (restricted) da EMA, cioè da impiegarsi solo in caso non vi siano altri antibiotici clinicamente efficaci per il trattamento della patologia riscontrata.

Ulteriori informazioni sulle molecole prototipo sono riportate nel sito del centro di riferimento per l'antibioticoresistenza (<https://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2021/03/Molecole-prototipo-e-loro-equivalenti-in-vitro.pdf>).

Alcune molecole presentano caratteristiche tali da renderle non efficaci nei confronti dei batteri Gram-negativi, pertanto nei test di sensibilità relativi a questi germi i valori di MIC non verranno riportati in quanto non affidabili. Appartengono a questa tipologia gli antibiotici verso i quali i Gram-negativi sono intrinsecamente resistenti quali la penicillina, l'oxacillina, i lincosamidi, i macrolidi e le rifampicine. Per altri microrganismi, in assenza di BP ufficiali, nel referto verrà inserito il solo valore di MIC senza ulteriore interpretazione. In questo caso la valutazione relativa all'opportunità d'impiegare una delle molecole saggiate dovrebbe basarsi quantomeno sui dati di letteratura scientifica inerenti alla farmacocinetica dell'antibiotico saggiato, valutando se la concentrazione del farmaco nella mammella può raggiungere valori superiori alla MIC del microrganismo testato, e permanervi per il tempo necessario ad espletare la sua azione (è consigliabile un valore superiore di almeno 3 volte alla MIC in vitro, qualora tale posologia sia contemplata nel foglietto illustrativo della specialità veterinaria prescelta).

L'impiego degli aminoglicosidi associati alle penicilline per il trattamento degli Enterococchi è efficace solo se questi batteri non presentano elevate caratteristiche di resistenza agli aminoglicosidi. A questo fine nel pannello MIC sono stati inseriti due pozzetti con alta concentrazione di gentamicina: pertanto i pozzetti ad elevata concentrazione di gentamicina (250 e 500 µg/mL) vanno considerati solo per le MIC degli Enterococchi. La valutazione di sensibilità o resistenza viene calcolata automaticamente dal sistema di lettura esperto che genera il rapporto di prova. Il risultato della gentamicina è predittivo anche per la kanamicina e gli altri aminoglicosidi.

Le molecole del pannello classificate come HstPCIA e/o categoria B (restricted) da EMA vanno prescritte solo quando le altre molecole non incluse in queste categorie non risultano clinicamente efficaci, e sulla base dei risultati del test di antibioticosensibilità.

Pannelli per anaerobi

Secondo quanto riportato nel documento CLSI M11 (CLSI, 2018), per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici di microrganismi anaerobi è necessario utilizzare la determinazione della MIC in agar o in brodo, a seconda della specie microbica considerata.

La MIC in brodo è ritenuto un metodo attendibile per specie microbiche appartenenti ai generi *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp., responsabili di importanti infezioni in medicina umana ma di scarso interesse veterinario. Tale metodo può essere anche utilizzato anche nei confronti di *Brachyspira hyodysenteriae*, agente eziologico della dissenteria emorragica del suino (manuale CLSI, VET06).

In ambito veterinario la maggior parte delle patologie causate da batteri anaerobi è attribuibile a specie appartenenti al genere *Clostridium* spp., verso le quali sono state registrate molteplici specialità veterinarie, ma la cui sensibilità, secondo CLSI, può essere saggiata solo attraverso la determinazione della MIC in agar, purtroppo non utilizzabile nella routine diagnostica a causa della sua complessità tecnica e difficoltà di automazione.

Secondo EUCAST la determinazione della MIC attraverso il test della microdiluzione in brodo risulta invece utilizzabile anche nei confronti di specie clostridiche d'interesse medico, e definisce alcuni break-point clinici per l'interpretazione dei risultati (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2021/v_11.0_Breakpoint_Tables_preliminary_version_201204.xlsx).

Sebbene tali breakpoint non siano disponibili per antimicrobici e specie clostridiche d'esclusivo interesse veterinario, alcuni laboratori dell'IZSVE hanno condotto studi di farmacosenibilità mediante diluizione in agar, su collezioni significative di ceppi di Clostridi appartenenti a specie responsabili di patologie animali (ad es. enterite necrotica del pollame sostenuta da *C. perfringens*, clostridiosi del coniglio sostenute da *C. spiroforme* e *C. perfringens*, enterite del suino sostenuta da *C. perfringens* e *C. difficile*) che hanno permesso di suggerire dei cutoff epidemiologici (ecoff), che possono risultare utili qualora non siano disponibili break point clinici.

Questi studi hanno permesso di osservare una sostanziale sovrapposizione dei valori di MIC50 (valore di MIC in grado di inibire la crescita del 50% dei ceppi testati) e MIC90 (valore di MIC in grado di inibire la crescita del 90% dei ceppi testati), ottenuti col metodo della diluizione in agar e con microdiluzione in brodo. In conclusione, sebbene il metodo della microdiluzione in brodo sia ritenuto attendibile da EUCAST per saggiare

microrganismi anaerobi Gram-positivi, l'interpretazione dei risultati, per alcune molecole d'interesse veterinario, non poggia su breakpoint clinici.

I pannelli per saggiare i microrganismi anaerobi sono due: uno dedicato solo a *Brachyspira hyodysenteriae*, e uno per gli altri anaerobi.

Il pannello per testare i microrganismi anaerobi diversi da *Brachyspira* spp., è composto dai principi attivi riportati nella seguente tabella.

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Ampicillina		X	Amoxicillina, Etacillina
Penicillina		X	
Tilmicosina	X		
Bacitracina			
Lincomicina			
Doxiciclina			
Tiamulina			
Tilosina			
Valnemulina			

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Per *Brachyspira hyodysenteriae* è disponibile una piastra dedicata che permette di saggiare i seguenti principi attivi:

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b
Lincomicina		
Doxiciclina		
Tiamulina		
Tilosina	X	
Tilvalosina	X	
Valnemulina		

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

I pannelli dedicati agli animali d'affezione

Dal 2021 in IZSVe i pannelli per testare la MIC negli animali da affezione (cane, gatto e cavallo) sono due: un pannello dedicato ai batteri Gram-positivi e uno dedicato ai batteri Gram-negativi. Nell'allestimento dei pannelli sono state considerate le principali patologie per le quali IZSVe riceve campioni diagnostici, ed in particolare la patologia urinaria, quella enterica e l'otite. Nei pannelli predisposti non è stato possibile includere tutti gli antibiotici utilizzabili in terapia. In questo contesto, infatti, i principi attivi scelti rispondono all'esigenza di rappresentare una o più molecole della classe considerata, le c.d. molecole prototipo, la cui valutazione può essere predittiva dell'attività di altre molecole, e altre molecole utili al clinico per la terapia. In entrambi i pannelli, la definizione di sensibilità e resistenza all'antibiotico rimanda alle Linee Guida emesse da organismi internazionali, in particolare EUCAST e CLSI. In taluni casi, i valori di BP sono stati estrapolati dalla bibliografia. I parametri utilizzati per definire un microrganismo sensibile, intermedio, resistente derivati da questi documenti, sono riferiti alla specie animale considerata, al microrganismo identificato e, nel caso del CLSI, al tipo di infezione (per es. cute, tessuti molli, apparato urinario).

Inoltre, in taluni casi, in assenza di valori di BP per la specie animale considerata, sono stati usati i valori proposti per l'uomo.

I range delle diluizioni dei principi attivi comprendono il BP di sensibilità e di resistenza alla molecola, e ulteriori diluizioni dell'antibiotico utili a saggiare l'andamento della sensibilità nel tempo della popolazione batterica di interesse.

In entrambi i pannelli sono state inserite diverse classi di antibiotici: beta-lattamici, cefalosporine, chinoloni, macrolidi, tetracicline, lincosamidi.

Per quanto concerne i pet appartenenti a specie non convenzionali, in assenza di BP, nel rapporto di prova verrà indicato il valore di MIC ottenuto senza ulteriori interpretazioni. Di seguito il pannello per testare batteri Gram-positivi:

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Penicillina			
		X	Penetamato
Ampicillina		X	Amoxicillina, etacillina
Amoxicillina/acido clavulanico		X	
Oxacillina			Meticillina, cloxacillina, flucoxacillina, nafcillina

Cefpodoxime	X		Cefalosporine a spettro esteso, oxymino-cefalosporine
Tetraciclina			Clortetraciclina, doxyciclina, minociclina, oxytetraciclina
Cefalessina			
Doxiciclina			Tetraciclina
Cefazolina			
Clindamicina			Clindamicina, lincomicina (pirlimicina)
Sulfamidico potenziato			Tutti i sulfamidici potenziati con trimethoprim
Enrofloxacin	X		Danofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, predofloxacina, (fluorochinolonici in genere)
Gentamicina		X	Tobramicina, apramicina
Eritromicina	X		Eritromicina, tulatromicina, gamithromicina, tilosina (per <i>Staphylococcus</i> spp.)
Florfenicolo			
Kanamicina		X	Neomicina, frameticina

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Nella piastra per i Gram-positivi sono presenti fra i beta lattamici sia la molecola di penicillina che l'oxacillina. Secondo il CRAB e quanto riportato nel CLSI VET 08 (2018), la sensibilità o la resistenza ai beta-lattamici per gli isolati di *Staphylococcus* spp. da campioni clinici può essere dedotta in laboratorio testando solo la penicillina (molecola rappresentante per saggiare la sensibilità alle penicilline penicillinasi-labili) e la cefoxitina o l'oxacillina. In particolare, l'utilizzo delle ultime molecole citate dipende dal ceppo in esame e dal metodo utilizzato (MIC o disk diffusion).

In generale, i ceppi di *Staphylococcus* spp. risultati oxacillina (cefoxitina)-sensibili possono essere considerati sensibili anche a:

- beta-lattamici in combinazione con altri agenti
- cefalosporine somministrate per via orale
- cefalosporine somministrate per via parenterale.

Nella lettura della piastra MIC e nel referto del laboratorio in caso di isolato appartenente al genere *Staphylococcus* spp. (in particolare *S. pseudintermedius*) si deve considerare l'esito del test alla penicillina e all'oxacillina secondo quanto riportato di seguito.

Penicillina	Oxacillina	Interpretazione
S	S	Sensibilità a penicilline e aminopenicilline
R	S	Sensibilità alle penicilline penicillinasi-stabili, a cefalosporine somministrate per via orale e parenterale e alle aminopenicilline potenziate con ac. clavulanico
R	R	Microrganismo non sensibile ad alcun beta-lattamico

Di seguito il pannello impiegato per saggiare i batteri Gram-negativi:

Principio attivo	HstPCIA ^a	HPCIA ^b	Molecole rappresentate (CRAB) ^c
Amikacina		X	
Amoxicillina+ Ac. Clavulanico		X	
Ampicillina		X	Amoxicillina, etacillina
Cefazolina			
Cefpodoxime	X		Cefalosporine a spettro esteso, oxymino-cefalosporine
Enrofloxacin	X		Danofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, predofloxacina, (fluorochinoloni in genere)
Cefalessina			
Gentamicina		X	Tobramicina, apramicina
Pradofloxacina	X		
Doxiciclina			Tetraciclina
Cefovecina	X		
Tetraciclina		X	Clortetraciclina, doxiciclina, minociclina, oxytetraciclina
Trimethoprim + Sulfametossazolo			Tutti i sulfamidici potenziati con trimethoprim
Kanamicina		X	Kanamicina e neomicina (frameticina)

^a Highest Priority Critically Important Antimicrobials

^b High Priority Critically Important Antimicrobials

^c CRAB: centro di referenza sull'antibiotico-resistenza

Alcune particolarità:

Nel pannello per i Gram-negativi, l'inserimento della cefazolina, cefalosporina di I generazione, è giustificato poiché è da saggiare separatamente nelle Enterobacteriaceae. Kanamicina e Gentamicina sono state incluse come da indicazione del CRAB, per *Staphylococcus* spp e per Enterobacteriaceae diverse da *Salmonella* spp.

I sistemi di reportistica utilizzati da IZSVe

Report pubblico

Nel sito di IZSVe è disponibile un report interattivo aggiornato semestralmente; tale report riassume i dati di sensibilità agli antimicrobici degli isolati raccolti nell'ambito dell'attività diagnostica effettuata sugli animali da reddito conferiti ad IZSVe e provenienti dal Triveneto.

I dati inseriti possono essere filtrati per specie batterica, specie animale, provincia o regione di interesse. Selezionando ad esempio per specie animale e patologia il sito consente di visualizzare graficamente, mediante mappe o istogrammi, la distribuzione territoriale delle MIC. Selezionando il patogeno di interesse è possibile visualizzare il numero totale di MIC eseguite e il numero di allevamenti di origine; inoltre, per ogni antibiotico saggiato, è possibile visualizzare il numero e la percentuale dei ceppi resistenti e il numero di allevamenti da cui provengono i ceppi batterici esaminati.

Report per utenti abilitati

I Medici veterinari che lo richiedono possono accedere ad un sistema di reportistica personalizzato che permette di avere a disposizione i risultati complessivi dei test di antibioticosensibilità originati nelle aziende in cui operano. Il report aggrega le informazioni per le specifiche aziende permettendo di seguire le variazioni di sensibilità nel tempo, sia a livello di singole aziende che di raggruppamento territoriale. Inoltre il report permette di aggregare i dati complessivi relativi a tutte le aziende seguite.

Bibliografia

- Wiegand I et al. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3 (2):163-174
- CLSI 2018. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – 9th Ed.* CLSI, Standard M11, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2018 .
- CLSI, VET08 (2018). *Performance standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility test for bacteria isolated from animals.* 4th ed.
- <http://eucast.org>
- <http://www.izslt.it/crab>



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie