



MONITORAGGIO DELLE FARMACOSENSIBILITA' IN CONIGLICOLTURA

*Luca Bano, Marzia Mancin, Ilenia Drigo, Michela Bonci,
Fabrizio Agnoletti*

Laboratorio di Treviso

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



Perché monitorare la farmacosenibilità?

Rientra tra gli scopi della farmacovigilanza (D.Lvo 193/2006)

- il controllo della sicurezza clinica dei farmaci negli animali
- il controllo delle possibili reazioni negative per l'uomo che manipola i farmaci
- la verifica dei residui dei farmaci (rispetto dei c.d. MRL stabiliti a livello UE) negli alimenti di O.A.
- controllo dell'assenza di effetti negativi per l'ambiente
- **sorveglianza epidemiologica sulla comparsa di fenomeni di farmacoresistenza**, causa di mancata efficacia terapeutica



La divulgazione dei risultati di farmacosenibilità *in vitro* è importante

1. PRIVATO: veterinari, aziende farmaceutiche e mangimistiche
2. PUBBLICO: ripercussione in sanità umana



NORMATIVA ZONOSI

direttiva 2003/99/CE , recepita D. L.vo 191, 04/04/06

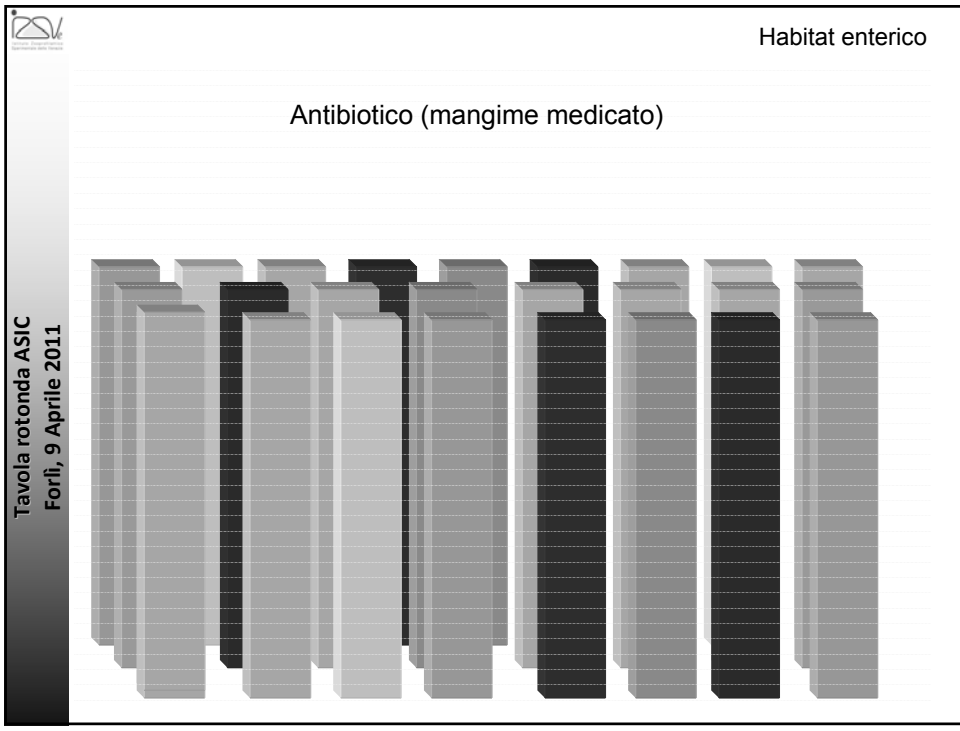
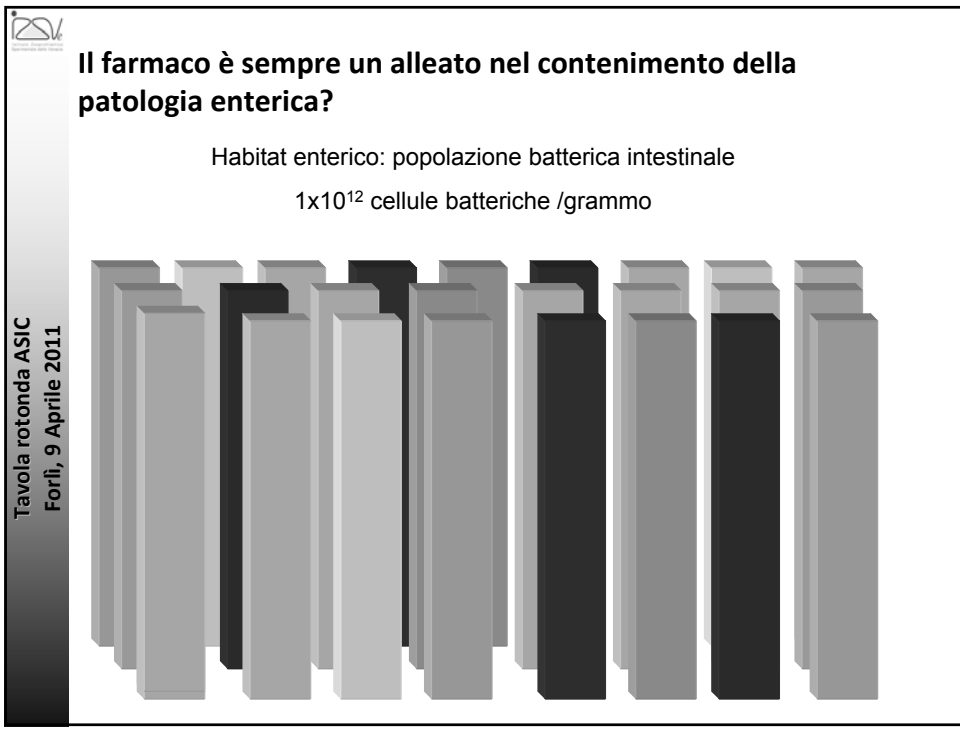
"Gli Stati membri provvedono alla raccolta, all'analisi e alla tempestiva pubblicazione dei dati relativi all'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici ad essi correlata ..." (Art. 3. Comma 2).

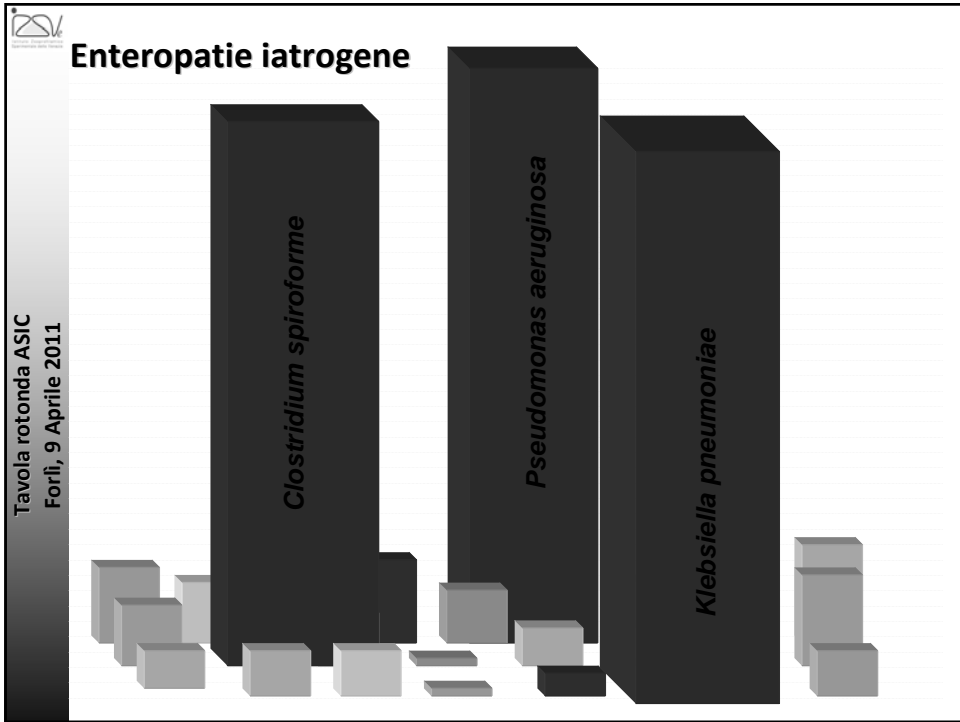
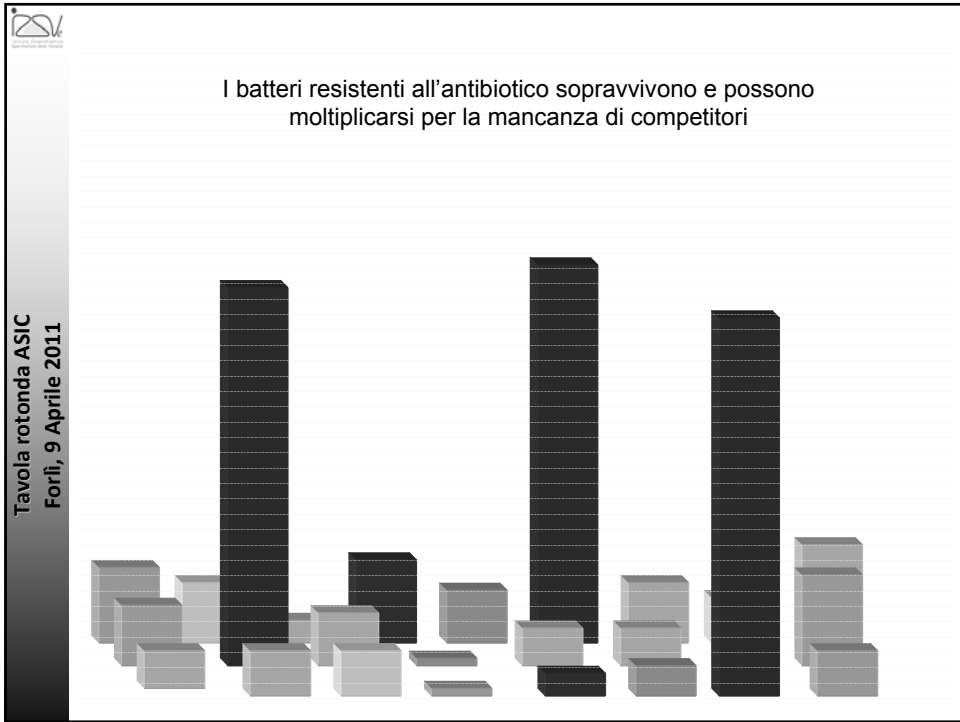


Come l'uomo può risentire delle farmaco-resistenze batteriche insorte nel mondo animale?

- possibilità di trasmissione all'uomo di ceppi che hanno acquisito resistenza nell'animale
- possibilità di passaggio di materiale genetico (coniugazione, trasduzione, trasformazione) contenente informazioni per la codifica di fattori di resistenza da ceppi animali a ceppi umani





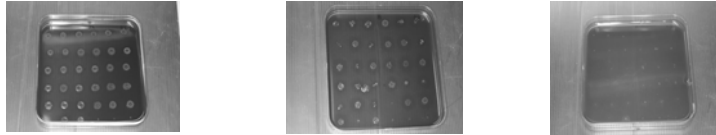




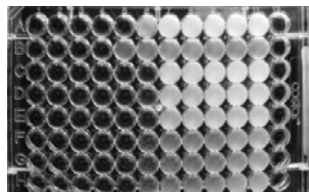
Come monitorare la farmacosenibilità?

1. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC)

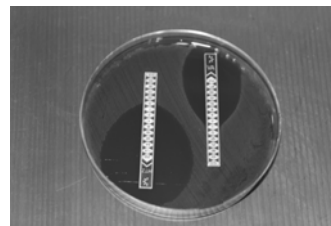
- ✓ metodo della diluizione in agar



- ✓ metodo della diluizione in brodo



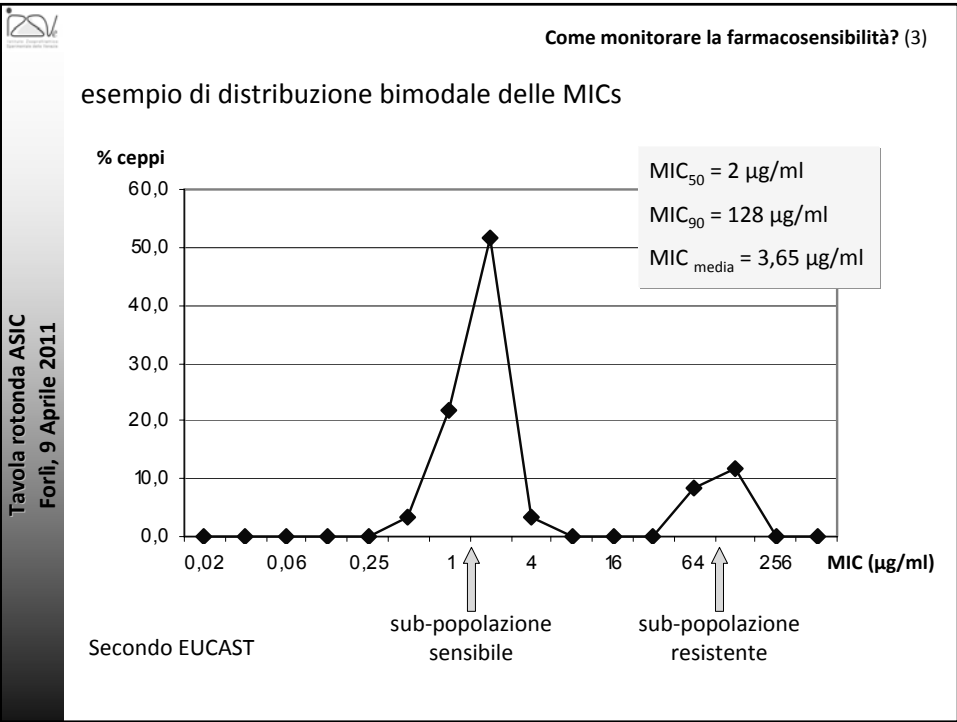
- ✓ E-test



Come monitorare la farmacosenibilità? (2)

Caratteristiche del metodo della determinazione delle MICs

- ✓ produce un dato numerico ($\mu\text{g/ml}$)
- ✓ MIC₅₀, MIC₉₀, elevata standardizzazione interlaboratorio (raccomandato CLSI, EUCAST)
- ✓ non suscettibile ad interpretazioni soggettive del risultato
- ✓ metodo d'elezione per tutti i microrganismi, anche i più esigenti (es. anaerobi)
- ✓ impiegato attualmente solo a scopo di ricerca su flore anaerobie presso IZSve di Treviso



Come monitorare la farmacosenibilità? (4)

2. Metodo Kirby Bauer (antibiogramma)



- ✓ metodo di diffusione in agar tramite dischetto
- ✓ i break points di riferimento sono fissati dal CLSI e si basano su risultati delle MICs
- ✓ i break points non sono definiti per molte specie microbiche di stretto interesse veterinario (valori forniti dalle ditte farmaceutiche)
- ✓ metodo rapido, di facile applicazione ed economico, utilizzato routinariamente nei laboratori diagnostici
- ✓ metodo non accettato per specie batteriche "fastidiose" (es. anaerobi)



3. Valutazione della prevalenza di geni di resistenza agli antimicrobici, nelle popolazioni batteriche

- ✓ esistono resistenze intrinseche e altre codificate su base genetica quali:
 - pompe di efflusso (es. alcuni geni *Tet*, gene *MefA*)
 - produzione di enzimi che degradano o alterano il principio attivo (geni codificanti β -lattamasi)
 - sostituzione o alterazione del target dell'antibiotico (*MecA*, *Erm*)
- ✓ I geni di resistenza plasmidici e trasposonici possono essere trasferiti orizzontalmente
- ✓ Geni di interesse zoonotico: *MecA* in *S. aureus*, *Van* in *Enterococcus* spp.
- ✓ Metodi biomolecolari: PCR (classica o real-time), microarray



FARMACOSENSIBILITA' NEL SETTORE CUNICOLO

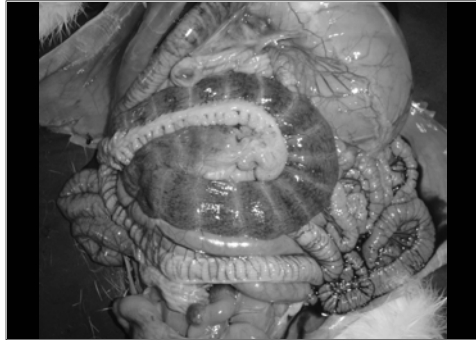


In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ?

1. Escherichia coli

Colibacillosi: una delle cause principali di enterite nel coniglio.

Nel coniglio non sono presenti sierotipi d'importanza zoonotica



In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

2. Klebsiella pneumoniae

Klebsiellosi intestinale: colpisce prevalentemente soggetti lattanti o prossimi allo svezzamento.

Importante causa d'infezioni nosocomiali nell'uomo





In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

3. Staphylococcus aureus

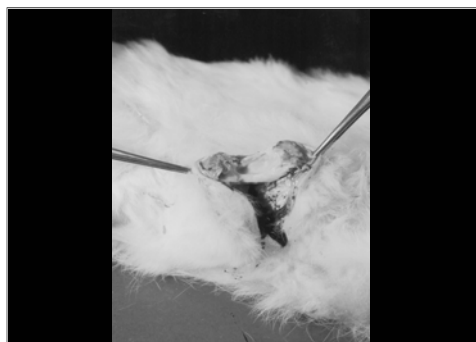
- Piodermiti



In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. Staphylococcus aureus

- Piodermiti
- Mastiti





In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. *Staphylococcus aureus*

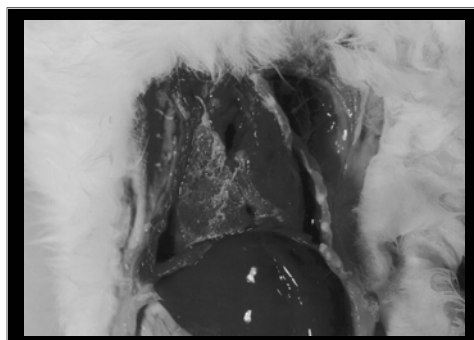
- Piodermiti
- Mastiti
- Stafilococcosi neonatale



In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. *Staphylococcus aureus*

- Piodermiti
- Mastiti
- Stafilococcosi neonatale
- Pleuro-polmoniti





In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. *Staphylococcus aureus*

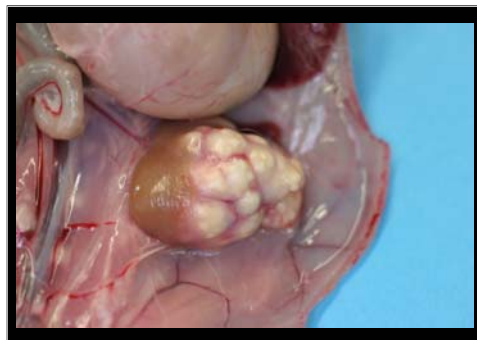
- Piodermiti
- Mastiti
- Stafilococcosi neonatale
- Pleuro-polmoniti
- **Artriti**



In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. *Staphylococcus aureus*

- Piodermiti
- Mastiti
- Stafilococcosi neonatale
- Pleuro-polmoniti
- Artriti
- **Infezioni apostematose ad organi parenchimatosi**





In quali specie microbiche monitorare la farmacosenibilità ? (2)

1. Staphylococcus aureus

- Piodermiti
- Mastiti
- Stafilococchi neonatale
- Pleuro-polmoniti
- Artriti
- **Infezioni apostematose ad organi parenchimatosi**
- **Metriti purulente**



- Responsabile di diverse patologie anche in medicina umana
- Importanti soprattutto i ceppi *MecA* POSITIVI



Dati di farmacosenibilità

	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
Anni presi in esame	2004, 2005, 2007, 2008, 2010	2003, 2004, 2007, 2008, 2010	2007, 2008, 2010
Molecole prese in esame	Enrofloxacina Flumequina SXT Colistina Apramicina Aminosidina Gentamicina Neomicina Florfenicolo Amoxi + ac. clav* Ampicillina* Tetraciclina*	Enrofloxacina Flumequina SXT Colistina Apramicina Aminosidina Gentamicina Neomicina Florfenicolo Amoxi + ac. clav* Ampicillina* Tetraciclina*	Amoxi+ ac. clav Cefalotina Enrofloxacina Oxacillina Penicillina SXT Tetraciclina Tiamulina
N° ceppi esaminati	2175	355	472

Metodo applicato: Kirby Bauer

* dati disponibile per gli anni 2007-2008-2010



Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011

Dati di farmacosensibilità (2)

Escherichia coli

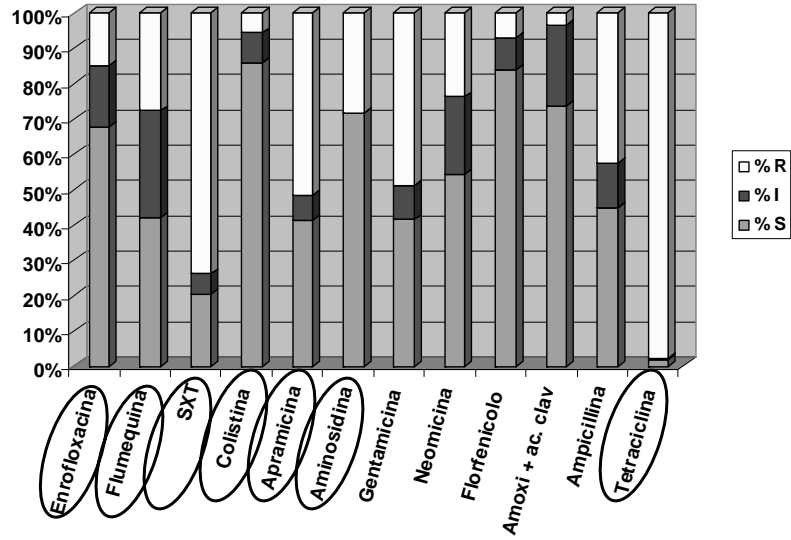
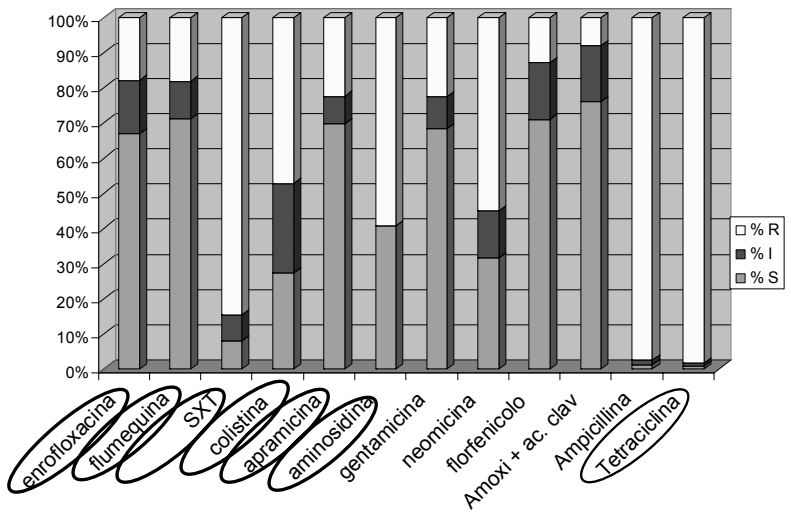


Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011

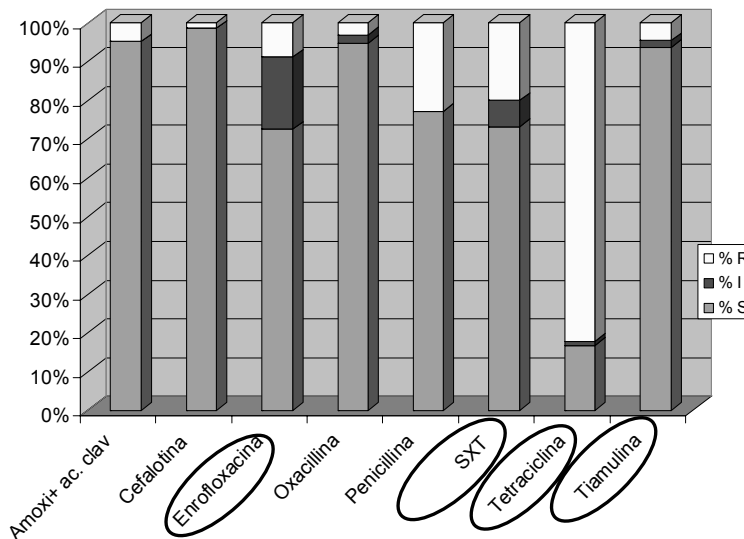
Dati di farmacosensibilità (3)

Klebsiella pneumoniae



Dati di farmacosenibilità (3)

Staphylococcus aureus



MONITORAGGIO DELLA FARMACOSENSIBILITÀ

✓ valutazione dell'esistenza di un "trend" delle variazioni della sensibilità agli antimicrobici nel tempo

✓ test impiegati:

- Test χ^2 per verificare l'uguaglianza tra le proporzioni
- Test χ^2 di Pearson per verificare la correlazione tra le proporzioni
- Test χ^2 di Armitage per verificare l'esistenza di un trend lineare *

* Il test di Armitage è stato eseguito solo per quelle molecole che hanno presentato, negli anni considerati, delle differenze significative della sensibilità e se queste variazioni erano correlate tra loro (cioè in base ai risultati ai primi 2 test)



Escherichia coli

Risultati (3)

2004-2010	Test di uguaglianza delle proporzioni	Test di correlazione	Test per Trend di Armitage	
ENROFLOXACINA	5.64e-08	5.64e-08	0.001765	CRESCENTE
FLUMEQUINA	3.03e-12	3.03e-12	3.95e-12	CRESCENTE
COLISTINA	0.0002168	0.0002168	0.07297	
APRAMICINA	3.932e-10	3.932e-10	3.972e-08	DECRESCENTE
AMINOSIDINA	5.134e-08	5.134e-08	5.921e-08	DECRESCENTE
GENTAMICINA	0.007339	0.007339	0.2623	
NEOMICINA	2.2e-16	2.2e-16	2.2e-16	DECRESCENTE
FLORFENICOLO	1.472e-05	1.472e-05	0.03613	DECRESCENTE
SXT	1.035e-06	1.035e-06	3.898e-05	DECRESCENTE
2007-2010				
AMOX+ACIDO CLA	1.466e-11	1.466e-11	8.29e-12	DECRESCENTE
AMPICILLINA	8.632e-05	8.632e-05	4.306e-05	DECRESCENTE
TETRACICLINA	0.02397	0.02361	0.01106	DECRESCENTE

Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011



Klebsiella pneumoniae

Risultati (4)

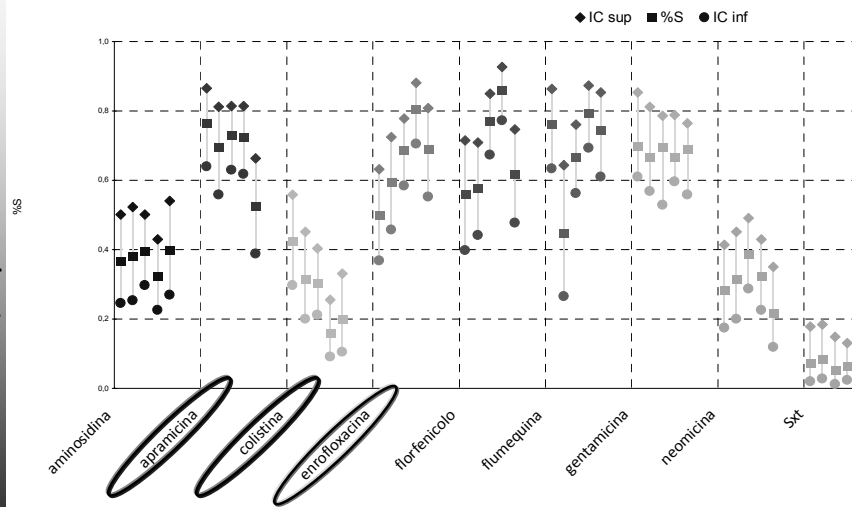
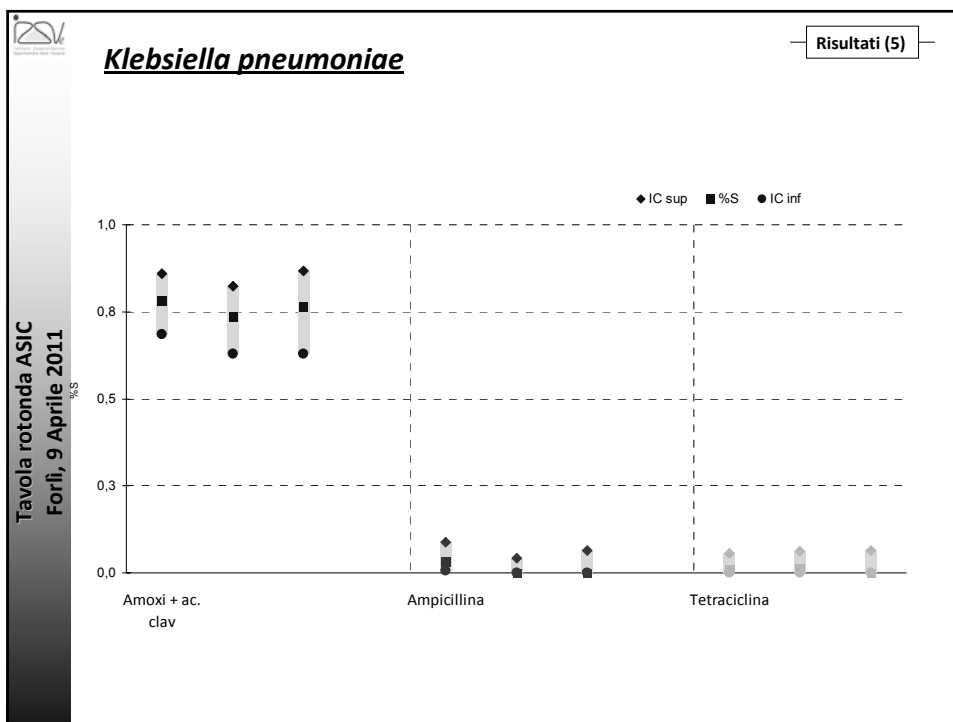


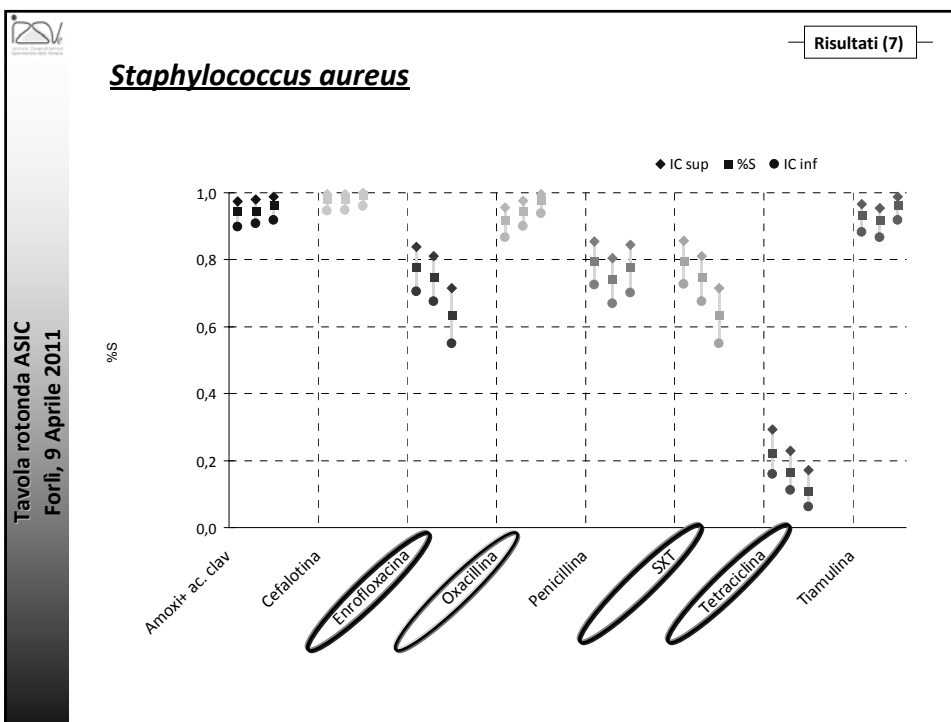
Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011



**Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011**

Klebsiella pneumoniae Risultati (6)

2003-2010	Test di uguaglianza delle proporzioni	Test di correlazione	Test per Trend di Armitage	
ENROFLOXACINA	0.002294	0.002294	0.0008267	CRESCENTE
FLUMEQUINA	0.005561	0.005561	0.2485	
SXT	0.658	0.658	0.5971	
COLISTINA	0.005518	0.005518	0.0004925	DECRESCENTE
APRAMICINA	0.04642	0.04642	0.02864	DECRESCENTE
AMINOSIDINA	0.8468	0.8468	0.9217	
GENTAMICINA	0.985	0.985	0.8822	
NEOMICINA	0.2989	0.2989	0.5803	
FLORFENICOLO	0.0001276	0.01375	0.5803	
2007-2010				
AMOX+AC. CLAVULANICO	0.769	0.769	0.7223	
AMPICILLINA	0.1057	0.9197	0.7223	
TETRACICLINA	0.7362	0.9661	0.7223	



Risultati (8)

Staphylococcus aureus

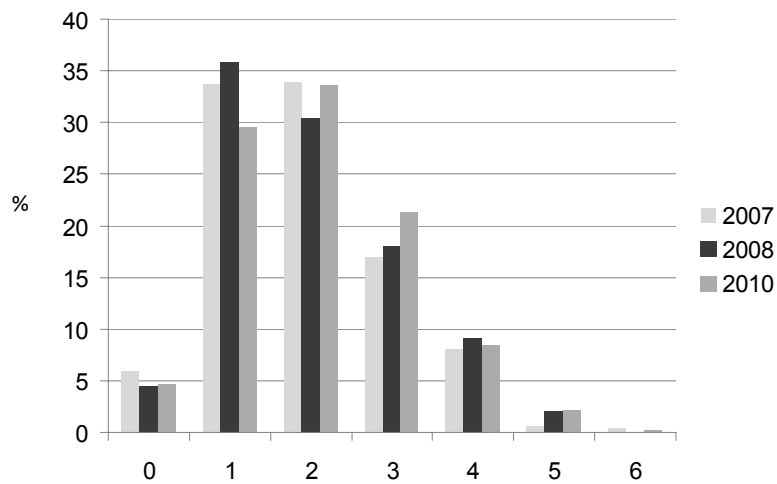
2007-2010	Test di uguaglianza delle proporzioni	Test di correlazione	Test per Trend di Armitage	
AMOX+ACIDO CLA.	0.6928	0.6928	0.4415	
CEFALOTINA	0.6656	0.6656	0.4255	
ENROFLOXACINA	0.01602	0.01602	0.006582	DECRESCENTE
OXACILLINA	0.0731	0.0731	0.02231	CRESCENTE
PENICILLINA	0.4748	0.4748	0.6772	
SXT	0.005601	0.005601	0.001692	DECRESCENTE
TETRACICLINA	0.03004	0.03004	0.008105	DECRESCENTE
TIAMULINA	0.2365	0.2365	0.2769	

Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011

Andamento della prevalenza di ceppi "resistenti" o "multiresistenti" nel tempo

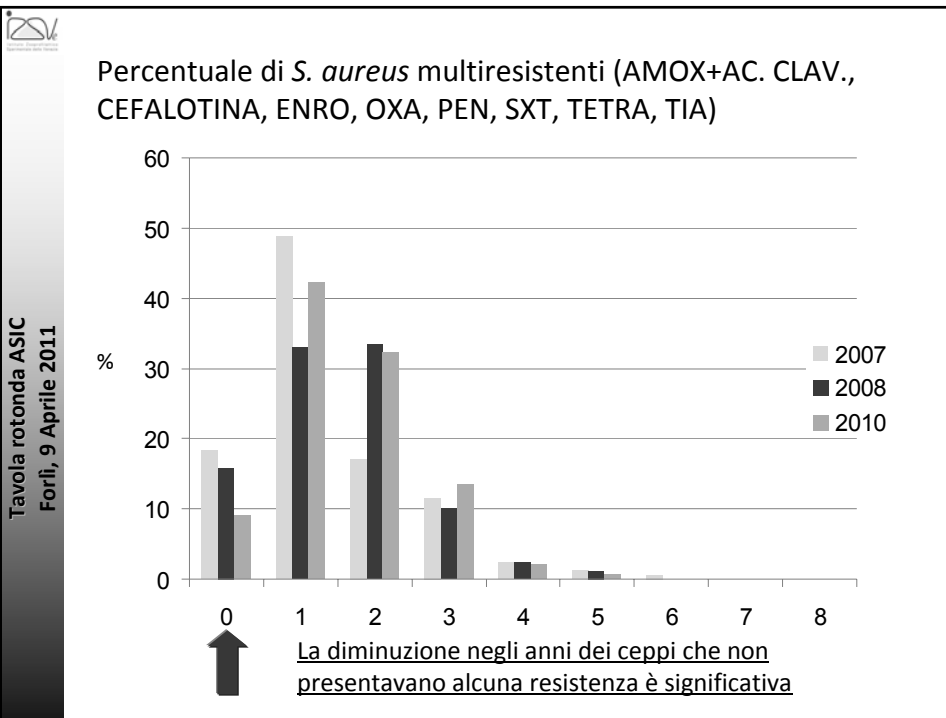
- obiettivo: studiare se la percentuale di ceppi multiresistenti è variata in modo significativo nel tempo
- metodo: Kirby Bauer
- test statistici: Test χ^2 , test χ^2 di Person, test χ^2 di Armitage
- Ceppi valutati: *E. coli*, *S. aureus*
- Molecole prese in esame:
 - ✓ *E. coli*: aminosidina, apramicina, SXT, colistina, enrofloxacin, flumequin
 - ✓ *S. aureus*: Amoxi+ ac. clav, Cefalotina, Enrofloxacin, Oxacillina, Penicillina, SXT, Tetraciclina, Tiamulina


Percentuale di *E. coli* multiresistenti (SXT, COL, ENRO, AMINO, APRA, FLU)



Nessuna differenza significativa





- 
Conclusioni (1)
- Escherichia coli**
- diminuzione significativa della sensibilità a farmaci registrati nel settore (aminoglicosidi)
 - diminuzione significativa della sensibilità a molecole, non registrate per il coniglio, ma impiegate in altre specie e nell'uomo (amoxi + ac. clav., ampic.), ma non per curare affezioni da *E. coli*.
 - queste ultime diminuzioni non dipendono quindi dalla pressione farmacologica nel settore d'ingrasso (per via orale i β -lattamici sono per lo più tossici)
 - Flumequina: "trend" in crescita, forse perché sotto-utilizzata negli ultimi anni a causa della bassa percentuale di ceppi sensibili (42%)
 - Enrofloxacin: "trend" in crescita (media ceppi sensibili = 68%) (quanto viene impiegata e quanto lo è stata in passato? costi?)



Klebsiella pneumoniae

- diminuzione significativa della sensibilità a colistina (28%) e apramicina (70%)
- Enrofloxacin: tendenza crescente nel tempo della percentuale di ceppi sensibili (utilizzo in passato? costi?)
- Nessuna variazione significativa nel tempo per molecole impiegate in terapia umana o in altre specie animali

Staphylococcus aureus

- le sensibilità alle beta-lattamine, farmaci di prima scelta in umana, risultano invariate nel tempo
- vi è un calo significativo delle sensibilità a farmaci utilizzati per via parenterale nei riproduttori (fluorchinoloni, tetracicline, sulfamidici)



CIRCOLAZIONE DI GENI DI RESISTENZA A FARMACI IMPIEGATI IN UMANA, IN POPOLAZIONI MICROBICHE D'IMPORTANZA ZONOTICA, ISOLATE DAL CONIGLIO

Gene *MecA* in *Staphylococcus aureus*

- forse il gene di resistenza più noto
- codifica una proteina target con minore affinità per i β -lattamici
- gene responsabile della resistenza a molti β -lattamici in umana
- testati **108 ceppi** di *S. aureus* tramite PCR

Gene *VanA* e *VanB* in *Enterococcus spp*

- gli enterococchi sono la prima causa di morte di pazienti ospedalizzati negli USA
- la vancomicina è il farmaco d'elezione per la terapia contro gli enterococchi
- testati **52 ceppi** di *Enterococcus spp.* isolati da coniglio



RISULTATI: MecA, VanA, VanB

**NESSUN CEPPLO SI È DIMOSTRATO
PORTATORE DEI GENI DI RESISTENZA**
MecA E Van

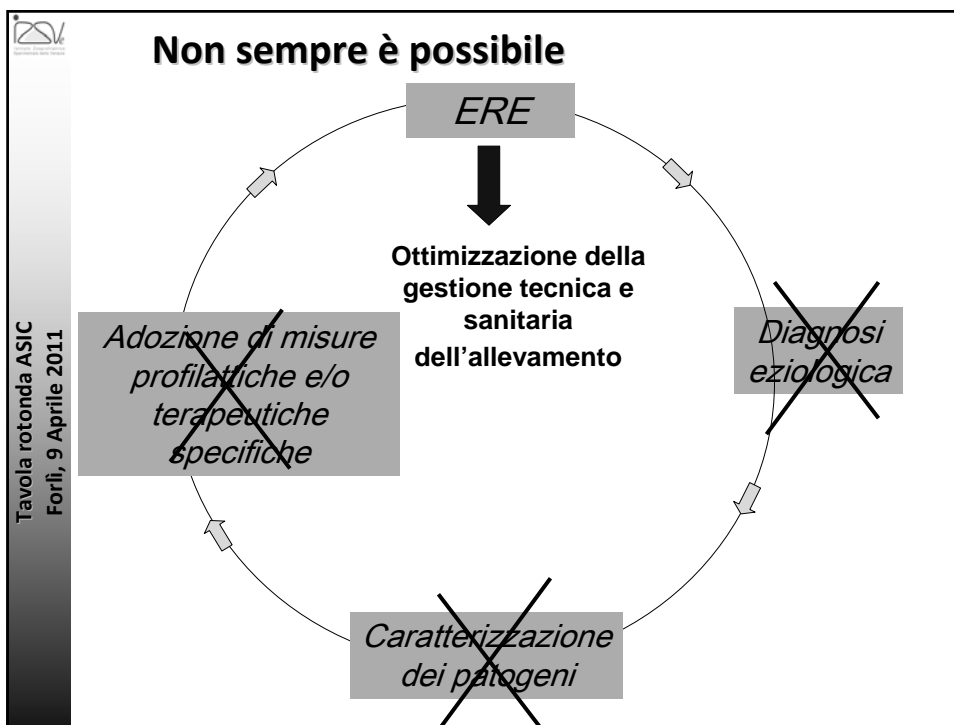
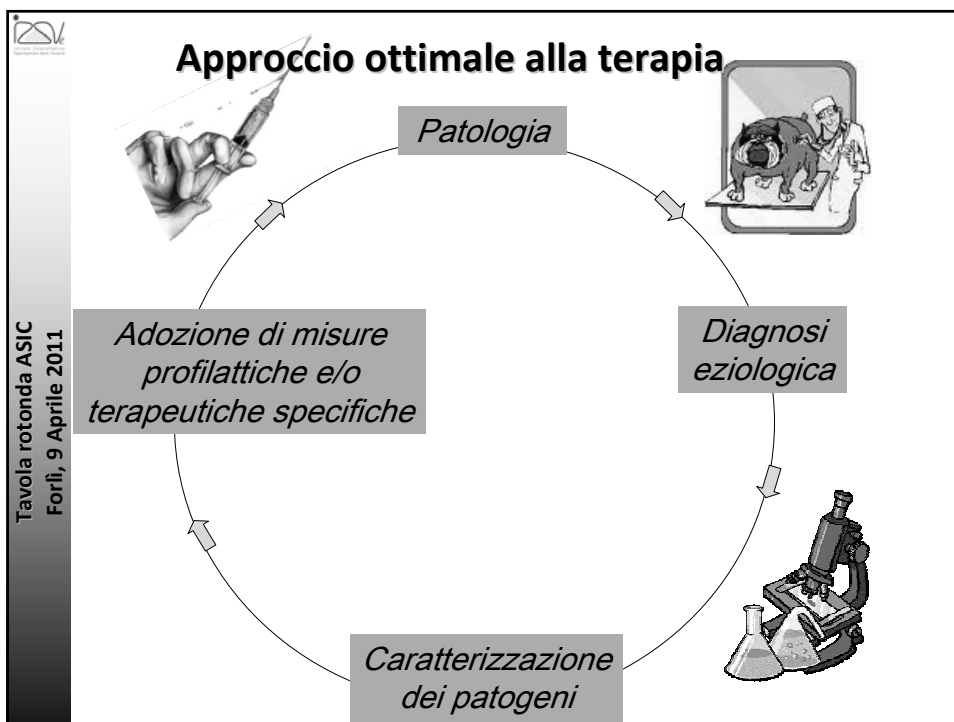
Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011



Dove comincia il ciclo?



Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011





INFO DA IZSVe

Dal 2005 presso i laboratori dell'IZSVe viene utilizzato un sistema di lettura automatica degli antibiogrammi (Videobact)

Dal 2010 nell'IZSVe esiste un sistema automatico di raccolta dei dati di farmacosenibilità prodotti in tutti i laboratori delle Tre Venezie che fornisce indicazioni anche sull'andamento del diametro degli aloni

I dati verranno elaborati annualmente e saranno a disposizione nel sito www.izsvenezie.it (a breve il report del 2010)

Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011



da giugno 2011



Vicolo Mazzini, Villorba di Treviso



Tavola rotonda ASIC
Forlì, 9 Aprile 2011