

# **LA FUNZIONE DEL LABORATORIO E LA COLLABORAZIONE CON IL MEDICO VETERINARIO**

**LUPPI ANDREA, DVM, PhD**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
Sezione di Reggio Emilia

**IZSLER**



MONTICHIARI, 6 DICEMBRE 2013

# SOMMARIO

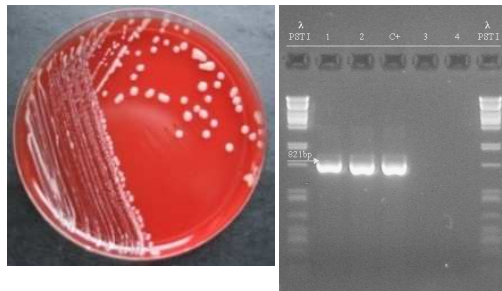


- **Compiti del laboratorio e in particolare del laboratorio di microbiologia**
  - Iter diagnostico
  - Esecuzione dei test di sensibilità agli antibiotici
- **Utilizzo dei dati ottenuti**
- **Attività diagnostica e di monitoraggio: risultati**

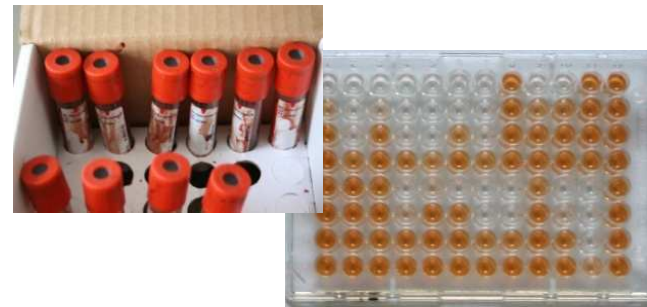
# COMPITI DEL LABORATORIO

- Realizzare la componente analitica del processo diagnostico

Diagnosi diretta



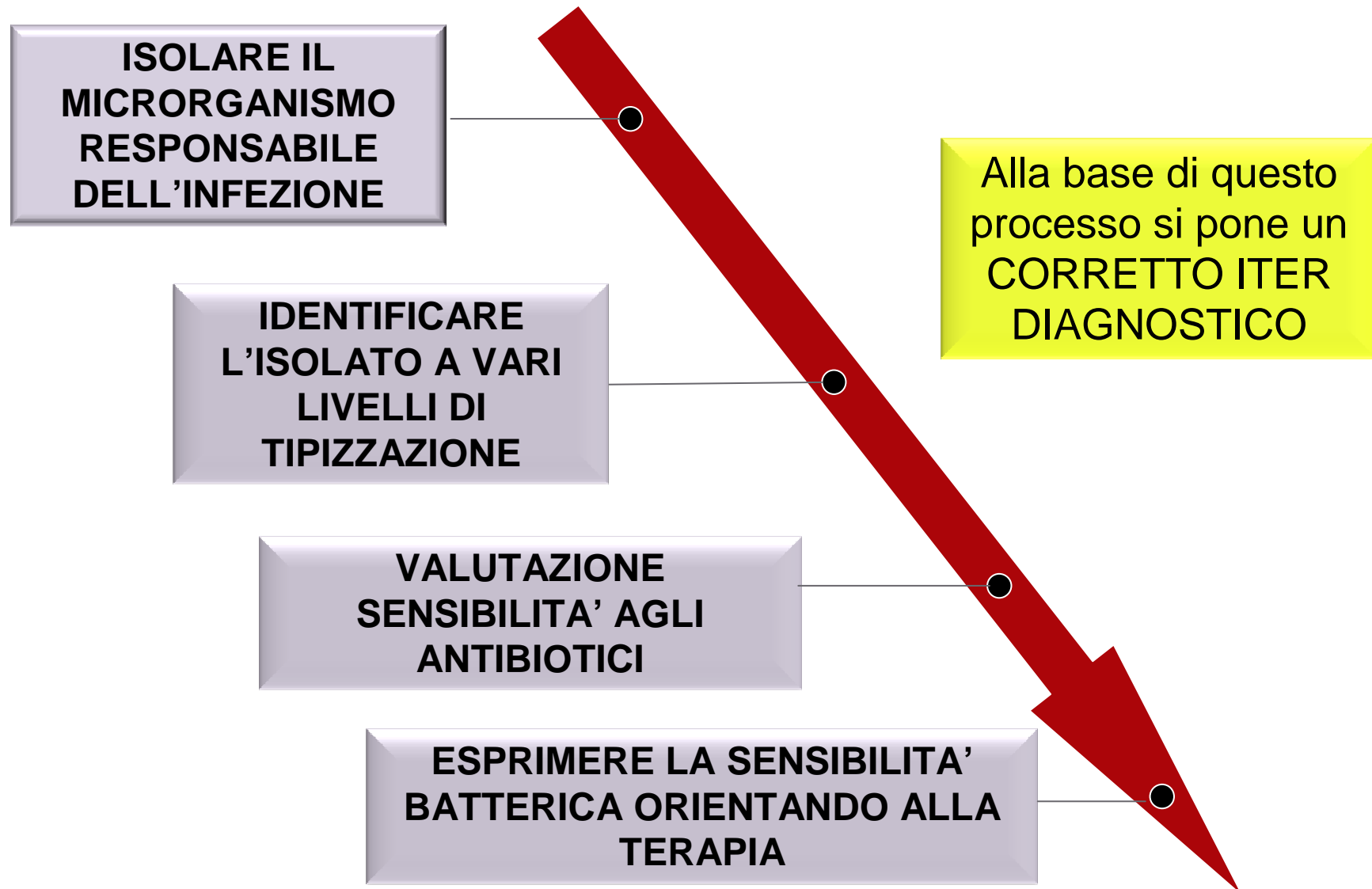
Diagnosi indiretta



- Applicare le metodiche diagnostiche secondo procedure validate e standardizzate
- Tempi di risposta
- Comunicazione dei risultati



# COMPITI DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA



# ITER DIAGNOSTICO

Problematica sanitaria

Anamnesi

Diagnosi clinica

Diagnosi anatomopatologica

Campionamento (scelta degli animali da campionare, dei campioni più appropriati, conservazione dei campioni)

Diagnosi di laboratorio



**DIAGNOSI**

## ANAMNESI

Età animali colpiti  
Numero animali colpiti  
Sintomatologia  
Terapie  
Vaccinazioni

## DIAGNOSI CLINICA



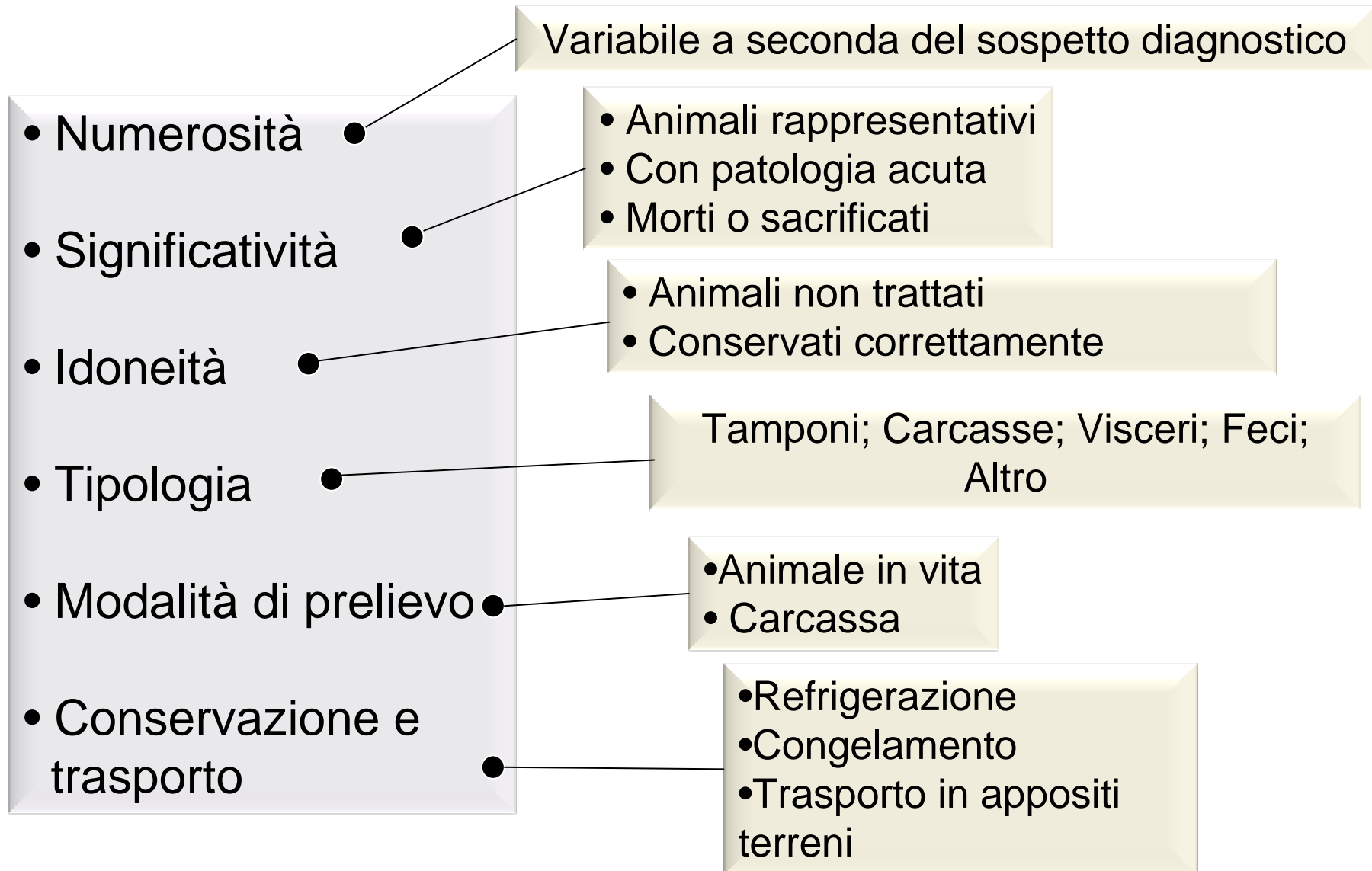
## PROBLEMATICAM SANITARIA



## DIAGNOSI ANATOMOPATOLOGICA

INDIRIZZO AL CAMPIONAMENTO

# CAMPIONI E CAMPIONAMENTO



# PATOLOGIA ENTERICA: ESAME BATTERIOLOGICO E CAMPIONAMENTO

Feci  
Tamponi rettali  
Visceri  
Carcasse



Carcasse e intestini

- valutazione anatomopatologica
- esame istologico

Feci

- non < 10 gr
- no pool
- da prelevare direttamente dagli animali
- possibile prelievo dal pavimento se fresche

Tamponi rettali

- non sempre consigliati
- possibile minor sensibilità rispetto alle feci
- terreni di trasporto (liquidi, solidi)

Conservazione: + 4°C; -20°C



<b>RICERCA</b>	<b>NECESSARIO PER LA DIAGNOSI</b>	<b>COMMENTO</b>	<b>METODICA</b>
<i>Clostridium difficile</i>	<b>GROSSO INTESTINO</b>	Materiale ben conservato	1. Porzione refrigerata per esame colturale 2. Porzione congelata per ricerca tossine
<i>Escherichia coli</i> <i>EPEC, EPEC, EDEC</i>	<b>CARCASSE, INTESTINO, FECI, TAMPONI RETTALI</b>	-	Esame colturale, tipizzazione sierologica, genotipizzazione
<i>Clostridium perfringens</i>	<b>CARCASSE O PICCOLO INTESTINO CON CONTENUTO</b>	Materiale ben conservato e non congelato	Esame colturale, prove di conferma, genotipizzazione, esame istologico
<i>Salmonella spp.</i>	<b>FECI, GROSSO INTESTINO, CARCASSE</b>	non < a 10 gr. Tamponi meno sensibili	Esame colturale, prove di conferma e sierotipizzazione
<i>Brachispyra spp.</i>	<b>FECI FRESCHE, (CARCASSE, COLON E CIECO)</b>	-	Esame colturale, prove di conferma e tipizzazione in PCR
<i>Lawsonia intracellularis</i>	<b>CARCASSE, INTESTINO, FECI</b>	-	Nested PCR, Esame istologico

# PATOLOGIA RESPIRATORIA: ESAME BATTERIOLOGICO E CAMPIONAMENTO

Carcasse e polmoni

- valutazione anatomopatologica
- esame istologico
- maggiori possibilità di prelievo e d'isolamento



Tamponi nasali

- meno indicati e minor sensibilità rispetto a carcasse e polmoni
- terreni di trasporto (liquidi, solidi)

BALF

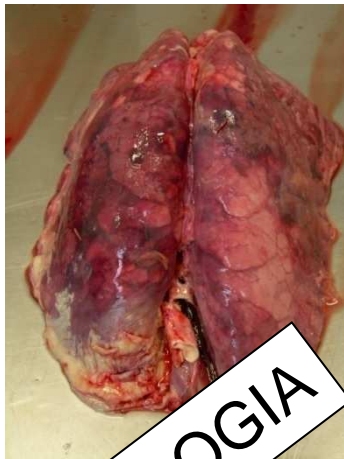
Conservazione: + 4°C; -20°C



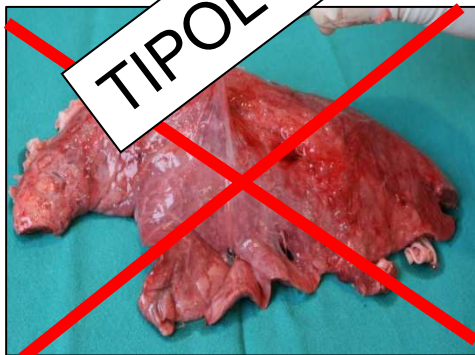
<b>RICERCA</b>	<b>NECESSARIO PER LA DIAGNOSI</b>	<b>METODICA</b>
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	CARCASSA/POLMONI (TONSILLE)	Esame colturale, identificazione sierotipo e biotipo
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CARCASSA/POLMONI BAL SECREZIONI NASALI	Esame colturale
<i>Pasteurella multocida</i>	CARCASSA/POLMONI TAMPONI TONSILLARI TAMPONI NASALI	Esame colturale
<i>Haemophilus parasuis</i>	CARCASSA/POLMONI (MEGLIO DA SOGGETTI EUTANIZZATI)	Esame colturale, sierotipizzazione, PCR
<i>Streptococcus suis</i>	CARCASSA/POLMONI RENE/MILZA	Esame colturale

# IDONEITA' DEL CAMPIONE

Il corretto campionamento e la conservazione del campione rappresentano un momento fondamentale del processo diagnostico



TIPOLOGIA



CONSERVAZIONE



# **DIAGNOSI DI LABORATORIO**

# ISOLARE IL MICRORGANISMO RESPONSABILE DELL'INFEZIONE

24 ore

*Escherichia coli*



48 ore

*Penicillium brevicompactum*



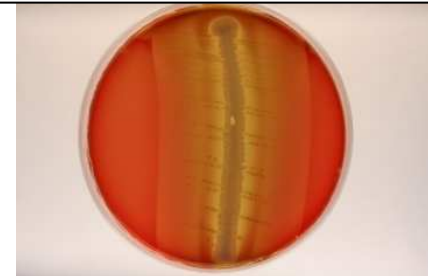
*Actinobacillus*

Ulteriori 24-48 ore sono necessarie per l'allestimento di prove di sensibilità agli antibiotici

*Pasteurella multocida*

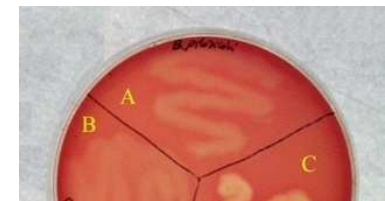


*Streptococcus spp.*



•5 giorni

*Brachispira spp.*



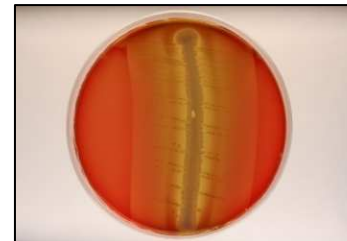
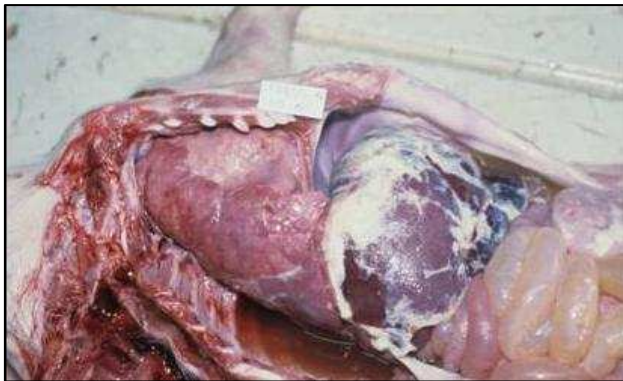
Ulteriori 5 giorni sono necessarie per l'allestimento di prove di sensibilità agli antibiotici



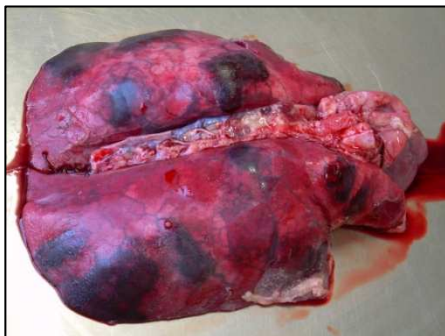
# IDENTIFICARE L'ISOLATO A VARI LIVELLI DI TIPIZZAZIONE



*Escherichia coli*  
F4/F18



*Haemophilus parasuis*  
Sierotipizzazione



*Actinobacillus pleuropneumoniae*  
Biotipo e sierotipo

# **VALUTARE LA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI**



# TEST DI SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI

## CARATTERI

- Prova di laboratorio fondamentale
- Orienta la terapia (individuale o di gruppo)
- Necessario che abbia presupposti di evidenza e validità
- Gli Standard Internazionali raccomandano due categorie di metodiche: per diluizione (in brodo o in agar) o per diffusione

## REQUISITI

E' necessario che la combinazione agente batterico/molecola antibiotica abbia subito un processo di standardizzazione da parte di Istituzioni Internazionali competenti.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

- validazione primaria della prova
- indicazioni affinché la prova possa essere riprodotta nei diversi laboratori periferici per la produzione di risultati validi
- per alcune molecole la validazione primaria a tutt'oggi questo processo non è stato possibile



# SELEZIONARE UN'APPROPRIATA BATTERIA DI ANTIBIOTICI DA SAGGIARE



## **OIE GUIDELINE 2.1 - OIE Terrestrial Manual 2012** LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

- limitare il numero di antibiotici da saggiare per aumentare praticità e rilevanza
- utilizzo di antibiotici rappresentativi per la classe a cui appartengono es. (cefalotina per tutte le cefalosporine di I° generazione)
- revisione periodica della sensibilità agli antimicrobici per evidenziare l'insorgenza di resistenze emergenti.



- Linee guida  
CRAB
- Molecole  
prototipo

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 (fluorochinoloni 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.



# METODI DI VALUTAZIONE IN VITRO DELLA SENSIBILTA' AGLI ANTIBIOTICI

## APPROCCIO FENOTIPICO

Metodo Kirby-Bauer (antibiogramma)

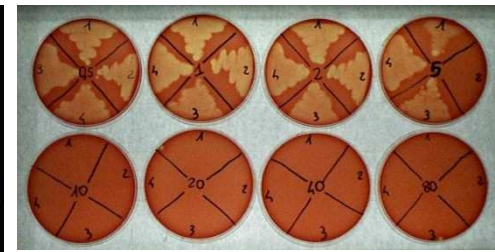
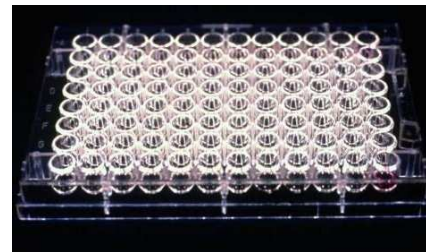


E-Test



Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

- Brodo diluizione
- Agar diluizione



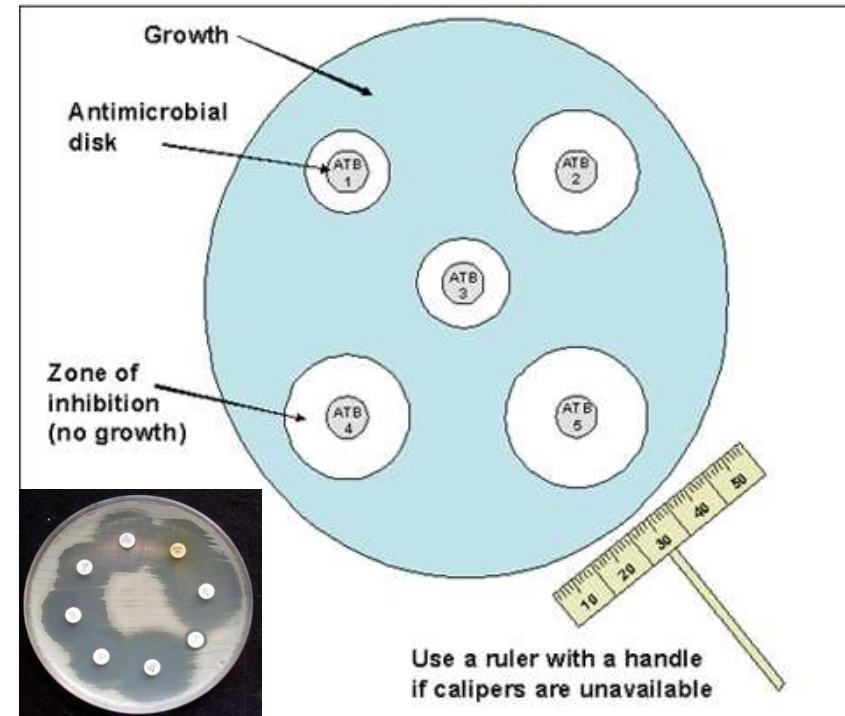
# DIFFUSIONE IN AGAR (Kirby-Bauer)

## VANTAGGI

- Tecnica standardizzata (CLSI)
- Flessibilità nella scelta degli antibiotici
- Facilità di esecuzione
- Economicità
- Flessibile

## SVANTAGGI

- Impossibilità di totale automazione
- Produce risultati qualitativi (categorie di sensibilità: S, I, R)
- Break point assenti per alcuni farmaci di interesse veterinario
- Non utilizzabile per “fastidious bacteria”
- Standardizzazione, validazione e controlli qualità



# E-test

## VANTAGGI

- Metodo quantitativo
- Facile esecuzione

## SVANTAGGI

- Costi superiori alla “disco diffusione”
- Impossibilità di testare numerose molecole contemporaneamente
- Mancanza di un’ampia varietà di strip antibiotate



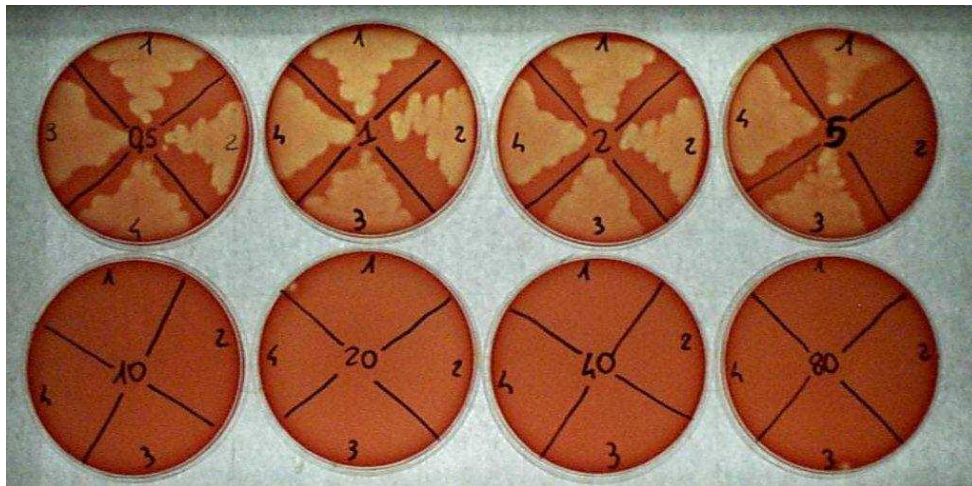
# MIC

- Il metodo più corretto per determinare l'efficacia di un antibiotico è la concentrazione **minima inibente (MIC)**
- Minima concentrazione in grado di inibire completamente la crescita batterica *in vitro*
- Questo metodo permette di stabilire una **scala di attività** dell'antibiotico per le diverse specie batteriche
- Dato quantitativo espresso come in  $\mu\text{g/ml}$
- Utilizzo diretto nella pratica solo se disponibili **break points clinici**
- **Cut off-epidemiologici** per riconoscere precocemente lo sviluppo di una resistenza

# MIC

## AGAR DILUIZIONE

- Diluizioni differenti dell'antibiotico da testare vengono utilizzate nella preparazione del terreno colturale



### VANTAGGI

- Metodo quantitativo ( $\mu\text{g/ml}$ )
- Metodo valido e preciso
- Raccomandata per la quasi totalità

### SVANTAGGI

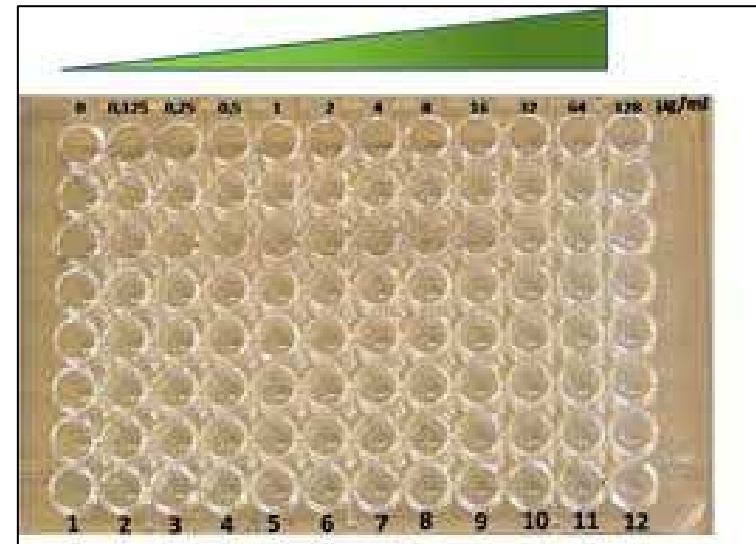
- Costoso
- Laborioso
- Non applicabile alla routine



# MIC BRODO DILUIZIONE

## VANTAGGI

- Metodo quantitativo
- Metodo valido e preciso
- No interpretazione
- Presenti Kit del commercio pre confezionati



## SVANTAGGI

- Costi superiori alla “disco diffusione”
- Poco flessibile

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	XNL 8	TIA 32	CTET 8	OXY 8	PEN 8	AMP 16	DANO 1	SXT 2/38	TYLT 4	TUL 4	CLI 16	SDM 256
B	XNL 4	TIA 16	CTET 4	OXY 4	PEN 4	AMP 8	DANO 0.5	SPE 64	TYLT 2	TUL 2	CLI 8	ENRO 2
C	XNL 2	TIA 8	CTET 2	OXY 2	PEN 2	AMP 4	DANO 0.25	SPE 32	TYLT 1	TUL 1	CLI 4	ENRO 1
D	XNL 1	TIA 4	CTET 1	OXY 1	PEN 1	AMP 2	DANO 0.12	SPE 16	TYLT 0.5	TIL 64	CLI 2	ENRO 0.5
E	XNL 0.5	TIA 2	CTET 0.5	OXY 0.5	PEN 0.5	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLI 1	ENRO 0.25
F	XNL 0.25	TIA 1	TIA 0.5	GEN 16	PEN 0.25	AMP 0.5	NEO 16	TYLT 32	TUL 32	TIL 16	CLI 0.5	ENRO 0.12
G	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	PEN 0.12	AMP 0.25	NEO 8	TYLT 16	TUL 16	TIL 8	CLI 0.25	POS CON
H	FFN 8	FFN 4	FFN 2	FFN 1	FFN 0.5	FFN 0.25	NEO 4	TYLT 8	TUL 8	TIL 4	POS CON	POS CON

# INTERPRETAZIONE

## Attraverso l'uso di breakpoint clinici

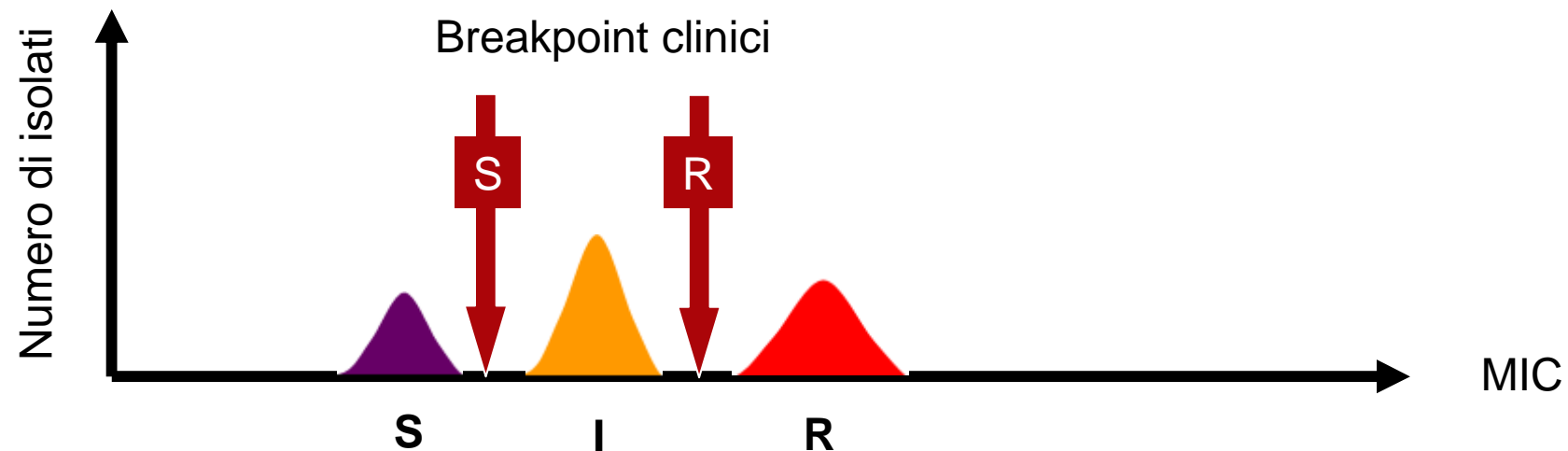
Usati nell'attività quotidiana del laboratorio di microbiologia clinica per fornire informazioni utili ai fini della terapia

## Categorie in base ai breakpoint clinici

Sensibile (**S**) associato ad un'elevata probabilità di successo terapeutico

Intermedio (**I**) associato ad un effetto terapeutico incerto

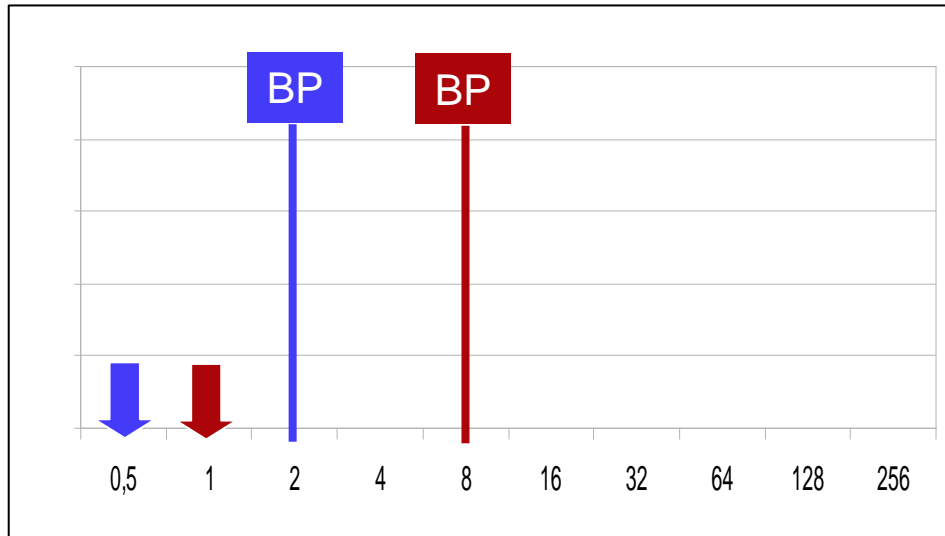
Resistente (**R**) elevata probabilità di fallimento terapeutico



**Come può essere utilizzato il dato fornito dalla MIC?**

# SCOPI TERAPEUTICI

Il risultato della MIC può orientare verso la scelta dell'antibiotico



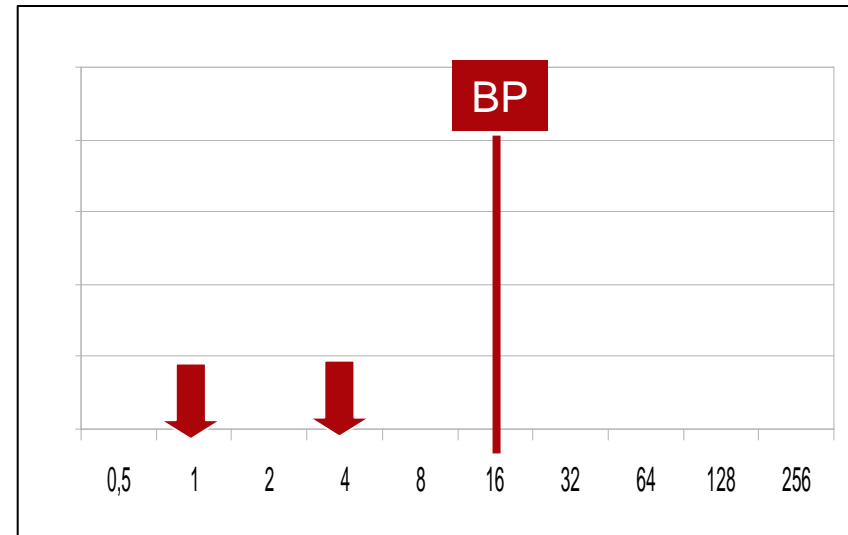
Antibiotico **X**  $8/1=8$

Antibiotico **Y**  $2/0.5=4$

Quale dei due farmaci ha il valore di MIC più favorevole?

Non è corretto comparare i valori assoluti di MIC di due molecole, ma occorre valutare il rapporto BP/MIC prediligendo quello con risultato maggiore

Il risultato della MIC può orientare verso la scelta del dosaggio



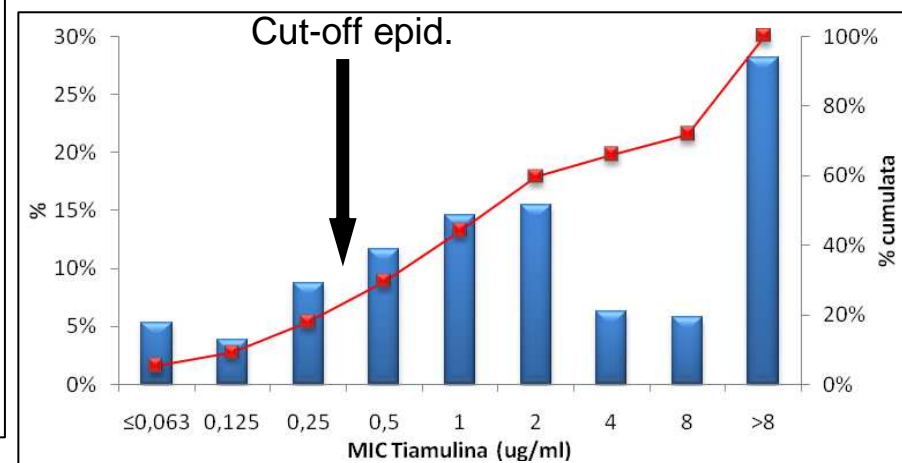
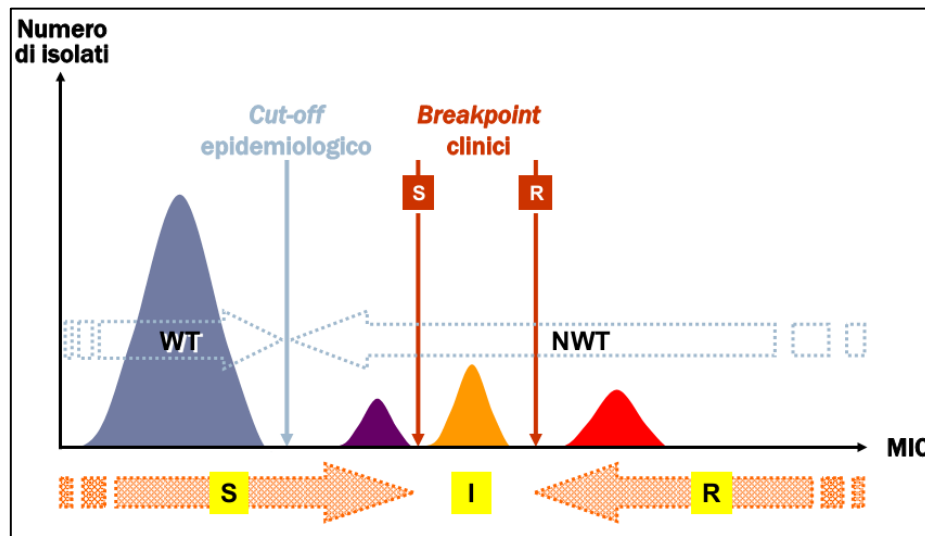
Ad esempio se per uno stesso farmaco antibiotico sono possibili diversi dosaggi e tempi di somministrazione

# SCOPI EPIDEMIOLOGICI

Il risultato della MIC può essere impiegato per monitorare e quantificare l'insorgenza di resistenze in una popolazione batterica nel tempo

Cut-off epidemiologici: utilizzati per riconoscere precocemente lo sviluppo di una resistenza.

Devono essere usati come la misura più sensibile dello sviluppo di una resistenza.



# **SCELTA DELL'ANTIBIOTICO ed APPROPRIATA TERAPIA**

Criteria microbiologici (risultati del test di sensibilità agli antibiotici del ceppo in esame)

Criteria farmacologici

Criteria economici

Esperienza personale

Caratteristiche del farmaco antibiotico

# **ATTIVITA' DIAGNOSTICA E DI MONITORAGGIO**

## **RISULTATI**

# IIZZSS OSSERVATORI PRIVILEGIATI

## Contatto quotidiano con il territorio

- Veterinari privati
- Servizi Veterinari
- Allevatori
  
- Attività diagnostica
- Applicazione test di sensibilità agli antibiotici
- Possibilità di acquisire dati su sensibilità/resistenza di ceppi batterici isolati
- Possibilità di osservazione/raccolta dati sull'aumento dei fenomeni di resistenza tra gli isolati



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

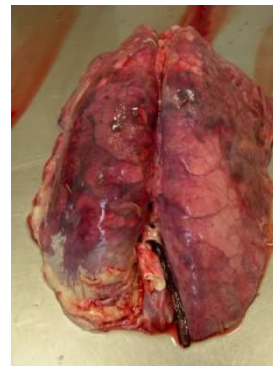
## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

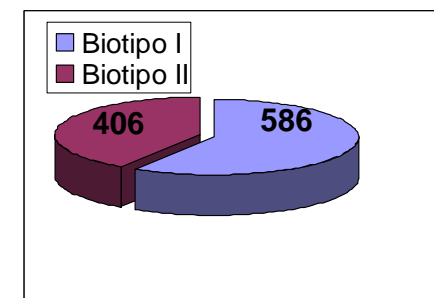


### Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine

Michele Vanni<sup>a,\*</sup>, Marianna Merenda<sup>b</sup>, Giuseppe Barigazzi<sup>b</sup>, Chiara Garbarino<sup>c</sup>,  
Andrea Luppi<sup>d</sup>, Rosalba Tognetti<sup>a</sup>, Luigi Intorre<sup>a</sup>



Periodo di riferimento  
1994-2009



992 Ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Sensibilità valutata tramite antibiogramma con il metodo della disco diffusione verso 23 antibiotici



# RISULTATI

Un incremento di resistenza, statisticamente significativo nel periodo 1998-2008 è stato osservato nei confronti di:

Antibiotico	1998	2008
amoxicillina	11.1%	82.6%
ampicillina	14.8%	69.2%
amoxicillina/acido clavulanico*	0%	8.9%
cefquinome	16.4%	23.8%
SXT	11.5%	32.7%
tilmicosina**	28.6%	51.3%,

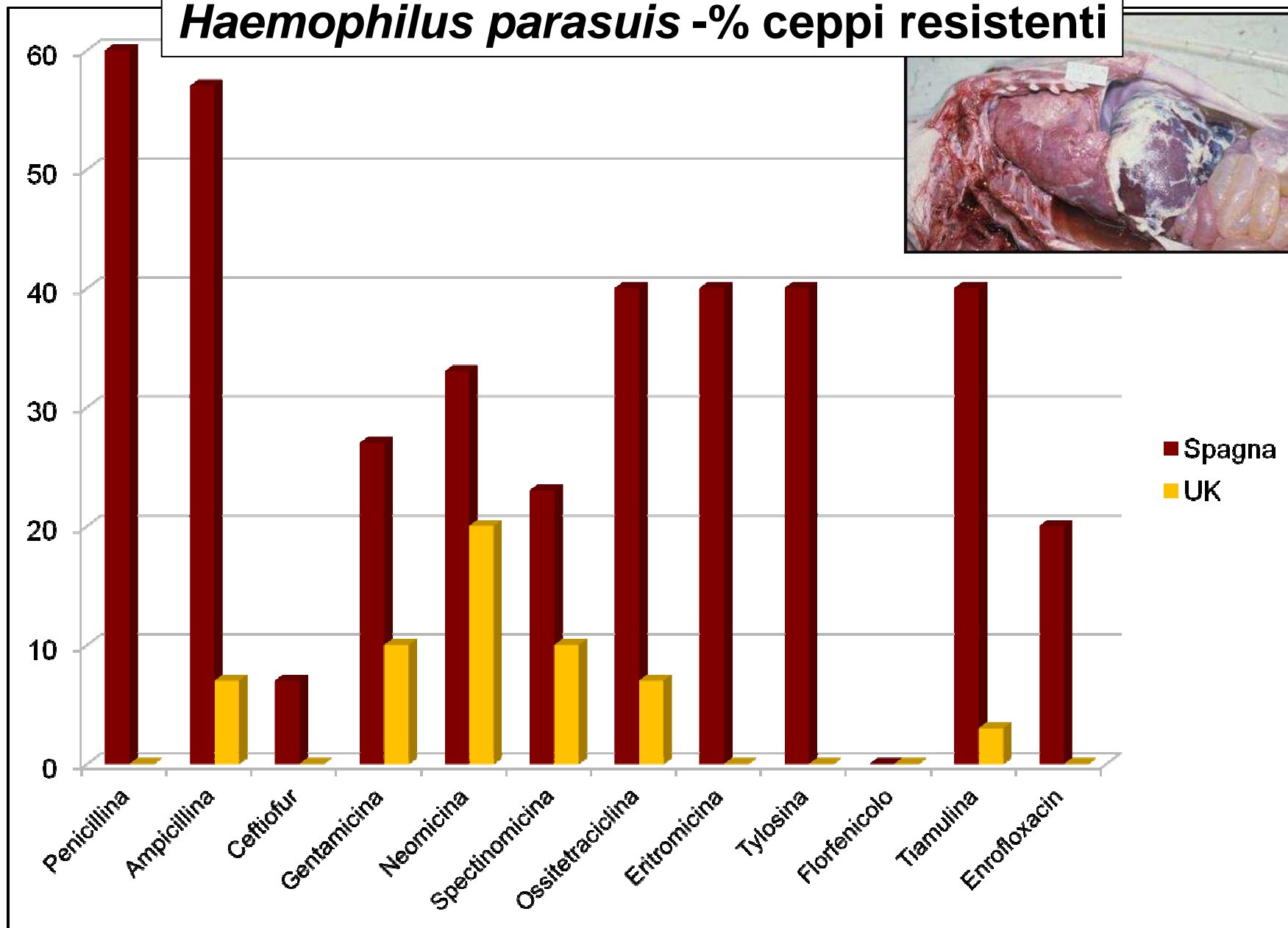
\* 1998-2008

\*\*1995-2009

Cambiamenti statisticamente non significativi, in termini di resistenza, sono stati osservati nei confronti di:

- ceftiofur, cefalexina
- doxiciclina, tetraciclina
- enrofloxacin, danofloxacin, flumequina,
- lincomicina
- tulatromicina
- tiamfenicolo, florfenicolo
- streptomina, kanamicina
- tiamulina

## *Haemophilus parasuis* -% ceppi resistenti



Martin de la Fuente et al., 2007

ORIGINAL ARTICLE

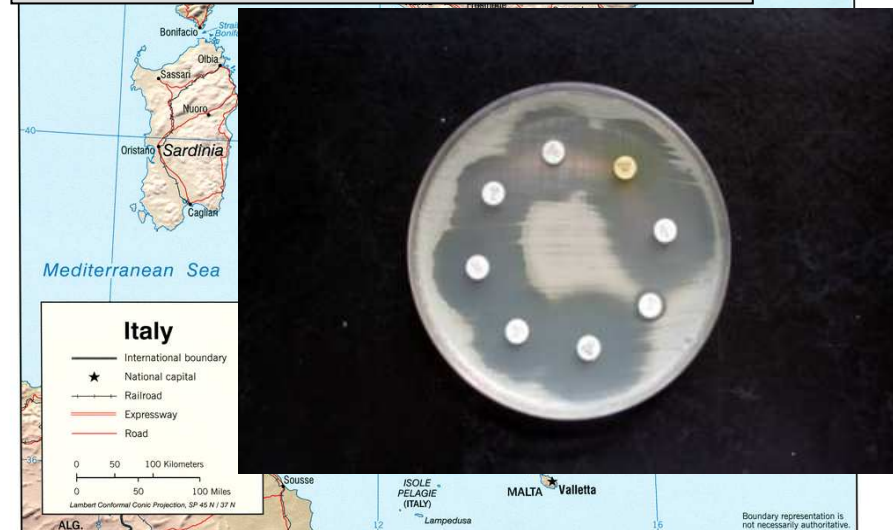
## Antimicrobial Resistance of F4+ *Escherichia Coli* Isolated from Swine in Italy

A. Luppi<sup>1</sup>, P. Bonilauri<sup>1</sup>, M. Dottori<sup>1</sup>, Y. GherPELLI<sup>1</sup>, G. Biasi<sup>1</sup>, G. MeriALDI<sup>1</sup>, G. Maioli<sup>1</sup> and P. Martelli<sup>2</sup>

- 442 ceppi di E.coli F4+
- Isolati da suini con diarrea (PWD)

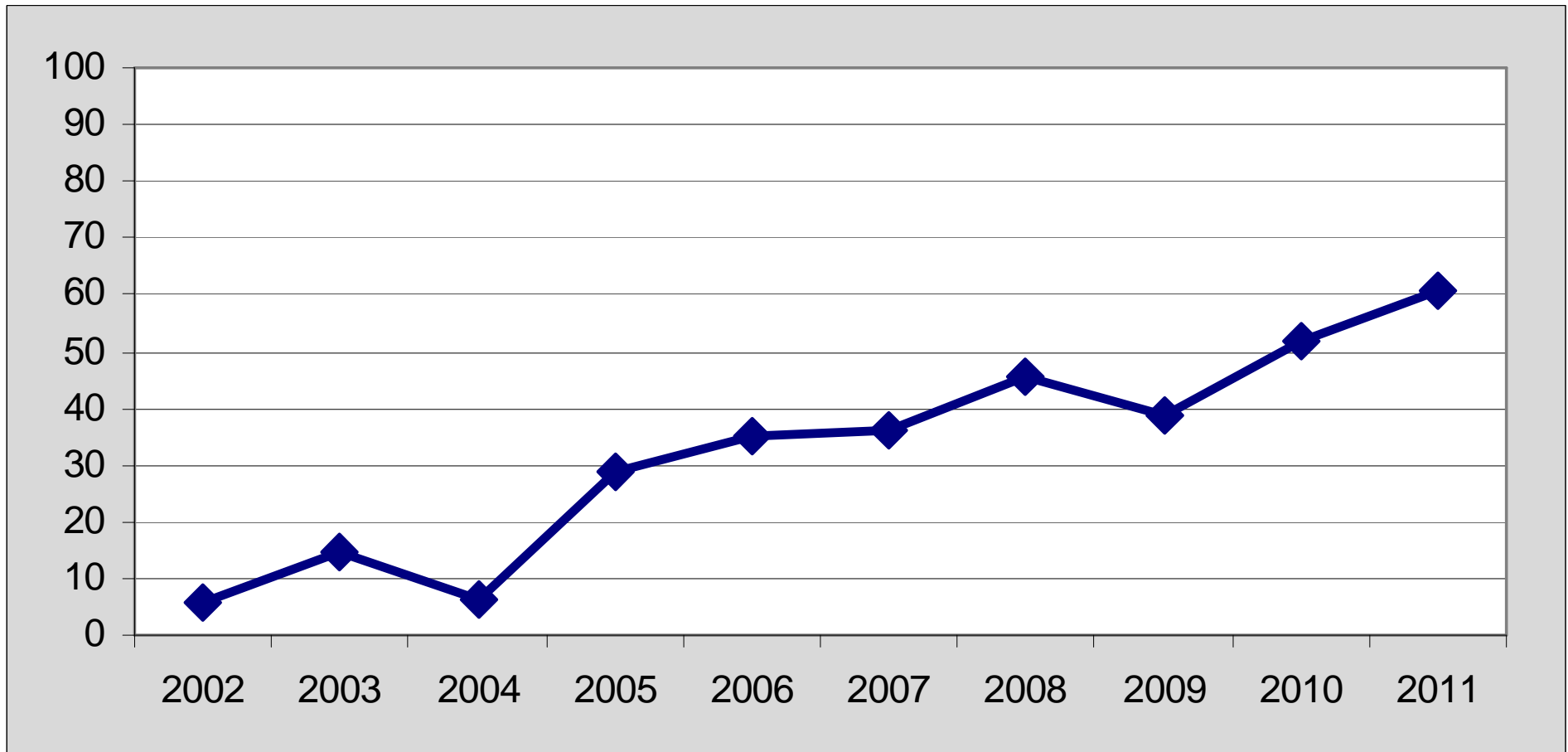


Sensibilità a 13 antibiotici



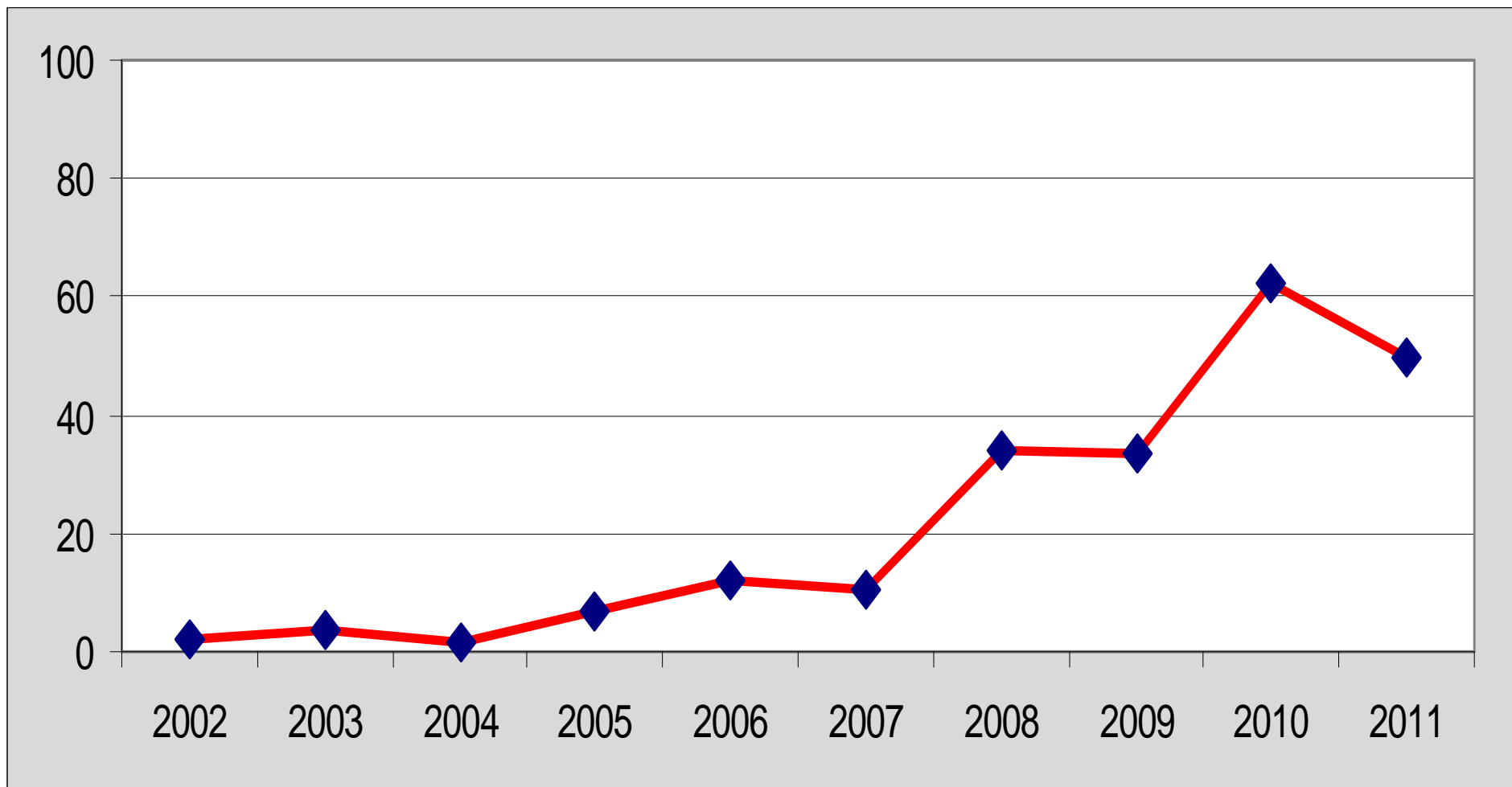
# RISULTATI

## Enrofloxacin



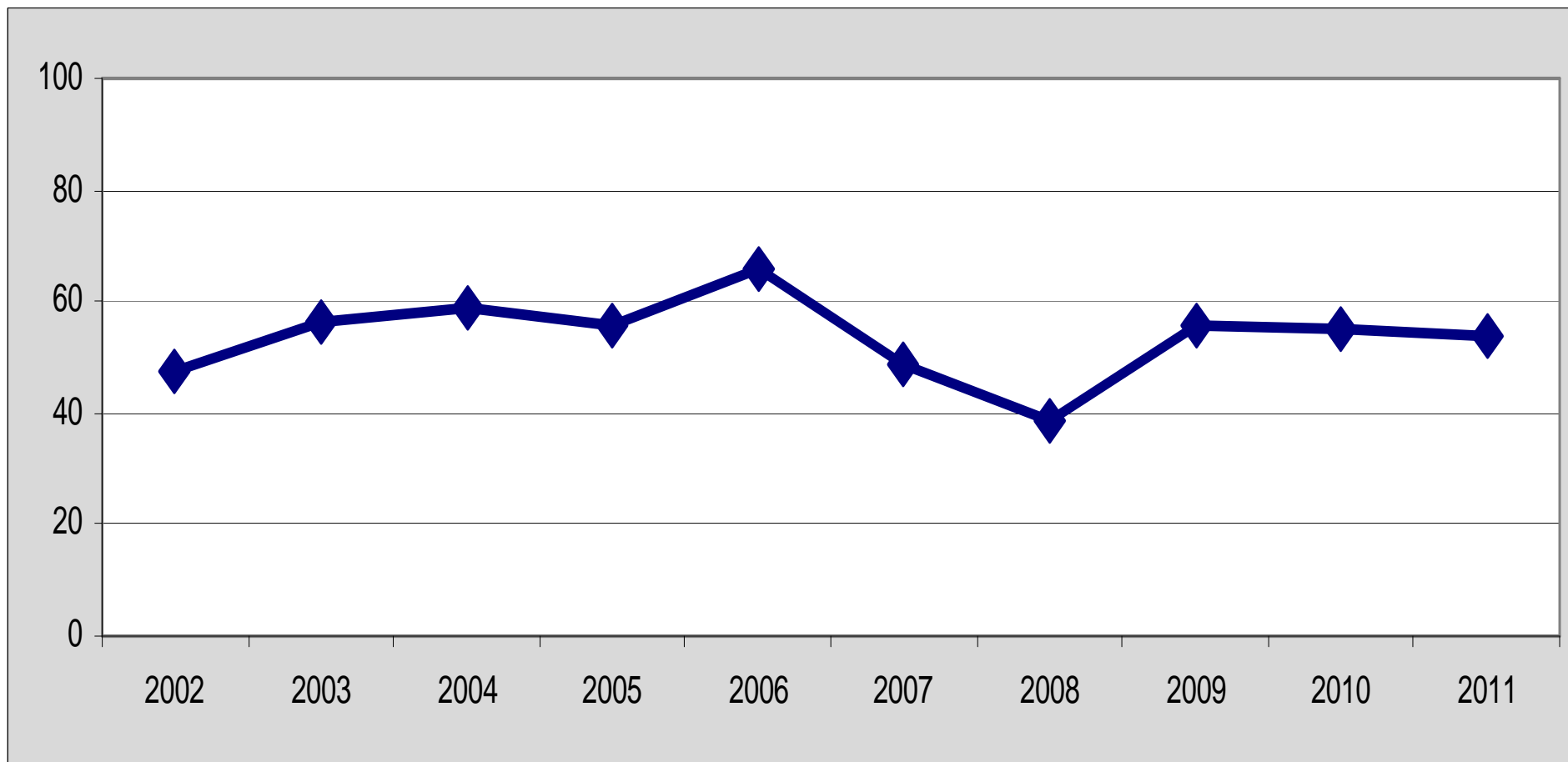
# RISULTATI

## Florfenicolo

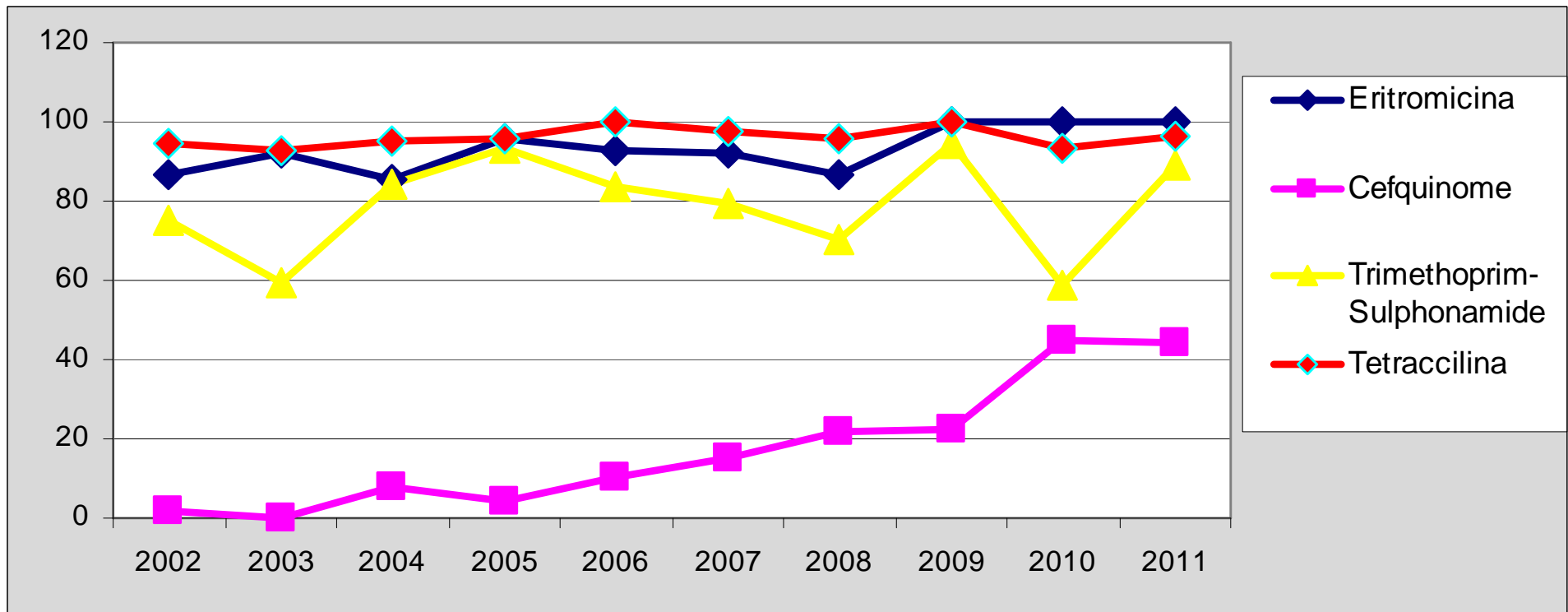


# RISULTATI

## Gentamicina



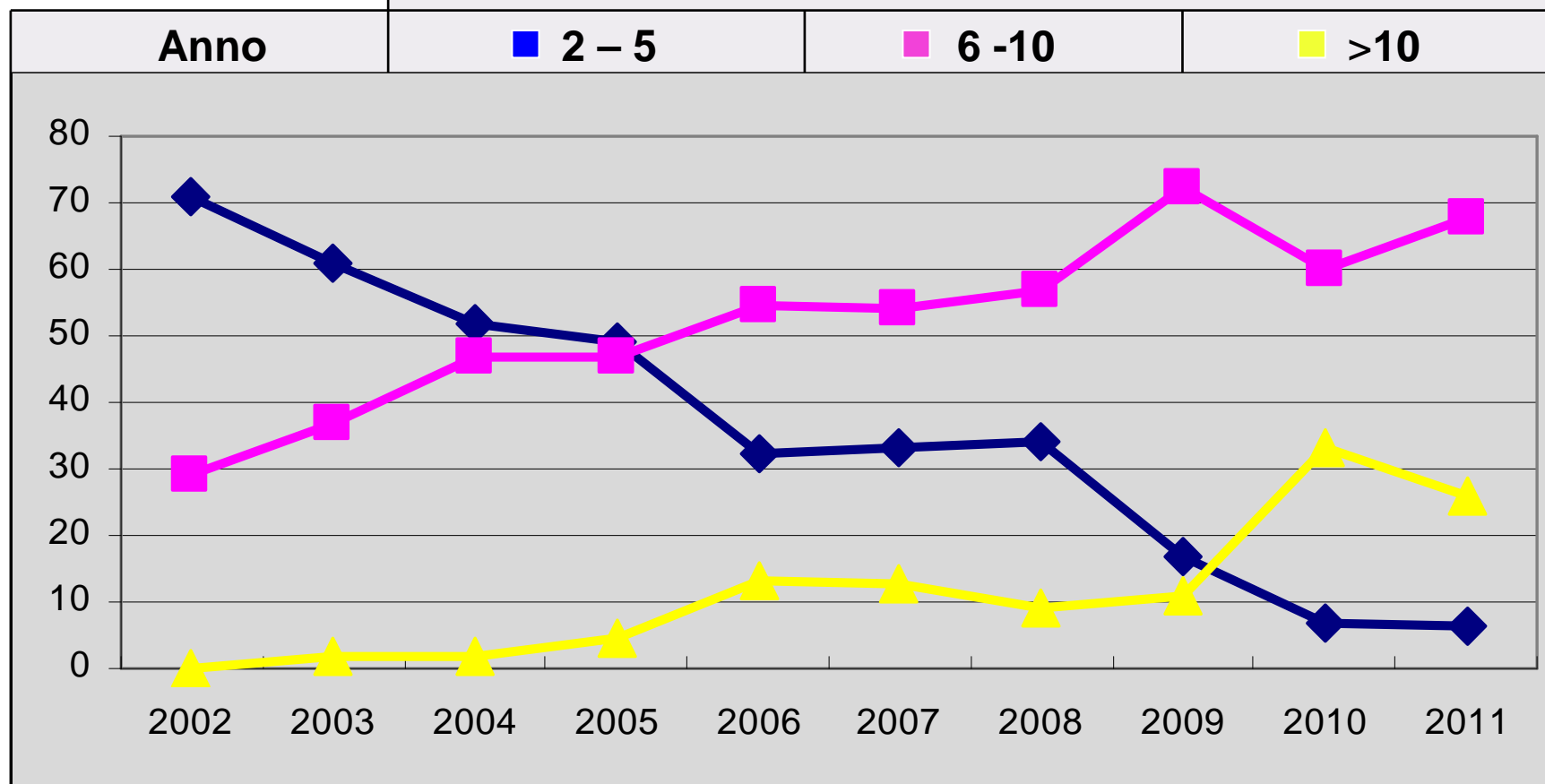
# RISULTATI





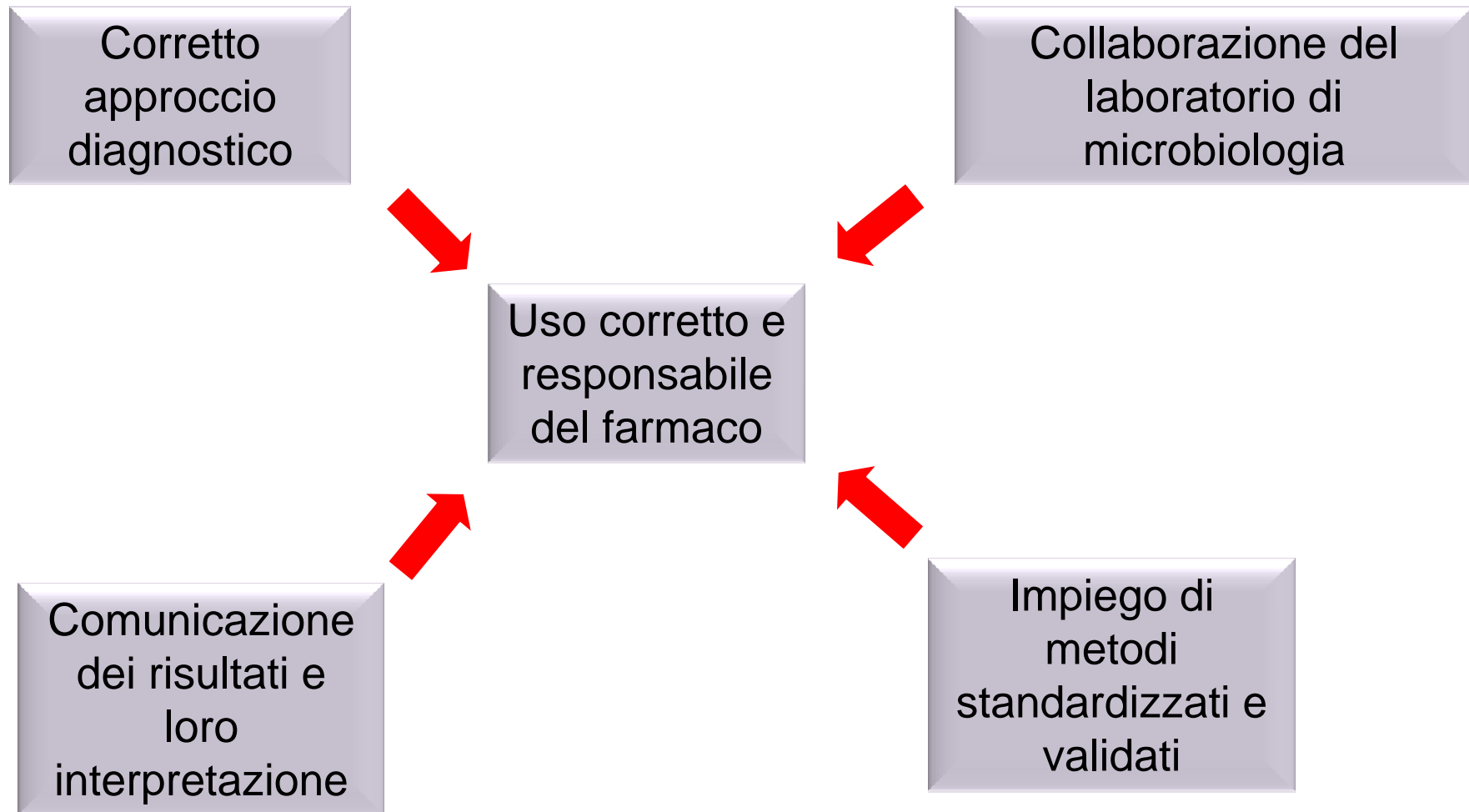
# ESCHERICHIA COLI F4 SUINO

## CLASSI DI MULTIRESISTENZA



Analisi statistica	P	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
	R <sup>2</sup>	0,9601	0,8634	0,7509
	r	-0,979847	0,929193	0,866545

# CONCLUSIONE: USO CORRETTO DEL FARMACO



# CONCLUSIONE :

## FARMACORESISTENZA

**Il suo monitoraggio richiede l'utilizzo di metodi:**

Economici

Standardizzabili

Rapidi

Facilmente reperibili

Confrontabili

Affidabili

Il metodo della disco diffusione è attualmente il più utilizzato nella routine diagnostica

Ad oggi l'impiego della MIC è stato per lo più riservato a studi epidemiologici o a casi particolari

La disponibilità di test commerciali per l'esecuzione della MIC con il metodo della diluizione in brodo potrebbe favorire un suo più ampio impiego nel monitoraggio dell'antibiotico-resistenza in talune popolazioni batteriche

*Grazie per l'attenzione!*

