


 Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU	 Ministero dell'Università e della Ricerca	 Italdomani	 SUS-MIRRI.IT
Ciclo di Training courses SUS-MIRRI.IT			
Recent advancements in the study of microbial strains of animal origin (molecular and non-molecular based methods). Applications for identification, typing and evaluation of resistance phenomena and pathogenicity features.			
Organizzatore: Università degli studi di Torino 26 gennaio 2024			
			
Modalità di erogazione: online, collegandosi a https://unito.webex.com/unito/j.php?MTID=mbe5f822a5656845016999ab7c767828c			
Docenti: Patrizia Nebbia, Andrea Peano			
PROGRAMMA			
14:00 – 15.00 Profili di resistenza in microrganismi di origine animali (batteri)			
15.00 – 16.00 Tecniche di identificazione di microorganismi di origine animale (funghi)			

1



**UNIVERSITÀ
DI TORINO**

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Patrizia Nebbia



2

1

RICERCA FATTORI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA: obiettivi in medicina veterinaria

SALUTE ANIMALE

- identificazione & AST

Guida il veterinario nella scelta del miglior trattamento

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

- Piani di sorveglianza
- Monitoraggio e prevenzione infezioni zoonosiche

Rivela e monitora le tendenze nella AR

SICUREZZA ALIMENTARE

- Qualità e sicurezza degli alimenti di origine animale

Presenza determinati di AR

3

3

RICERCA FATTORI DI ANTIBIOTICO RESISTENZA:

Collezione microbica

Sviluppo di
antibatterici

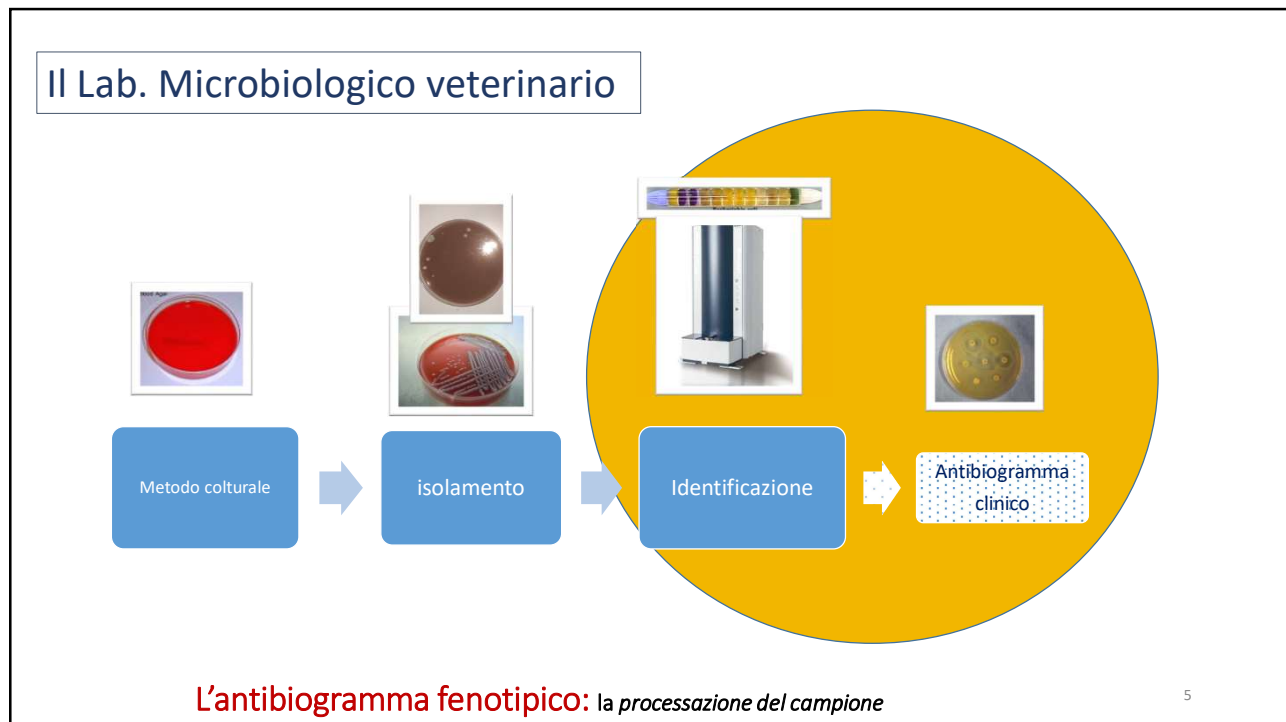
Validazione test di
sensibilità

Formazione e
ricerca clinica

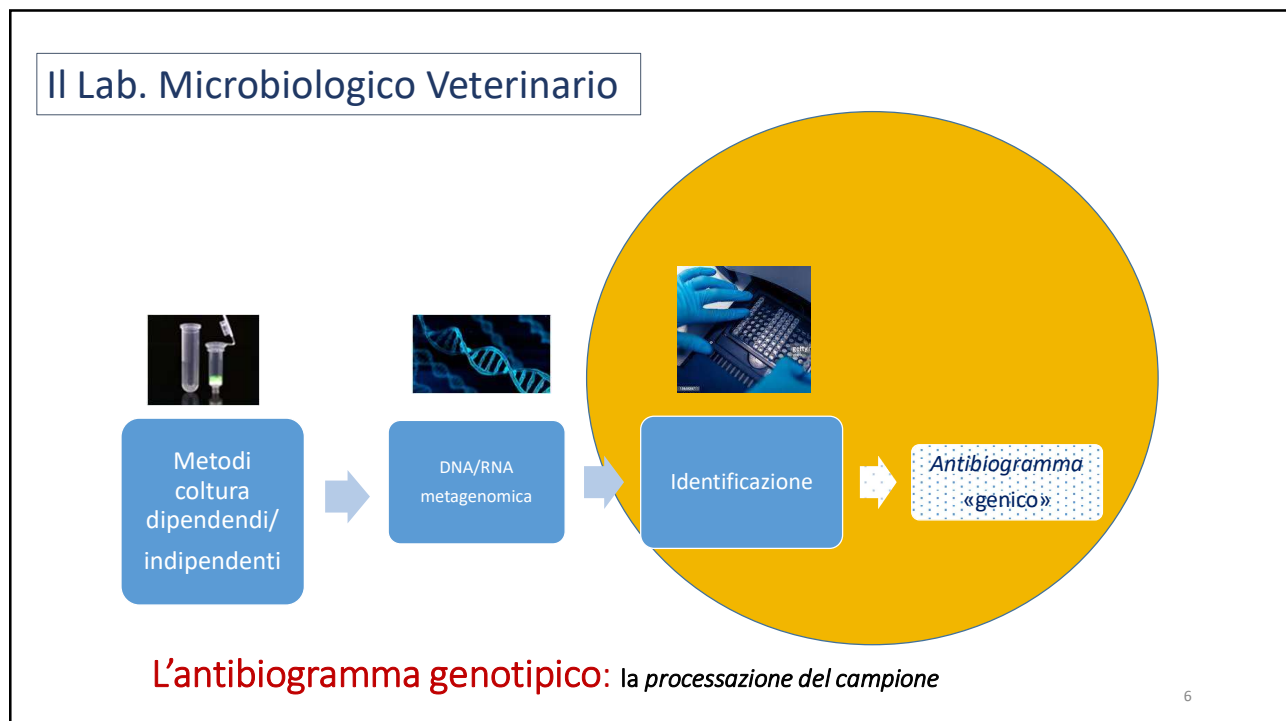


2

4



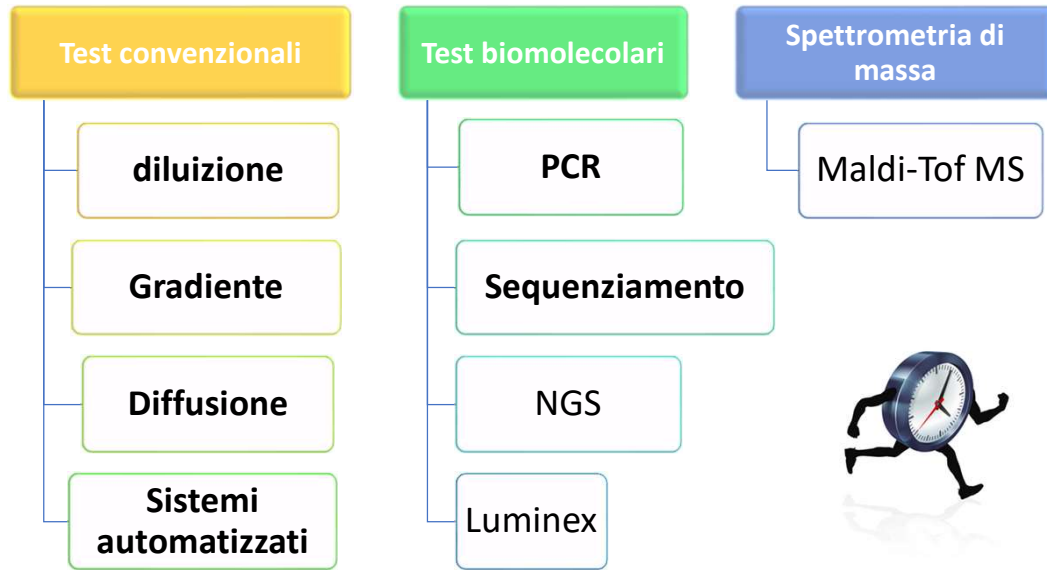
5



6

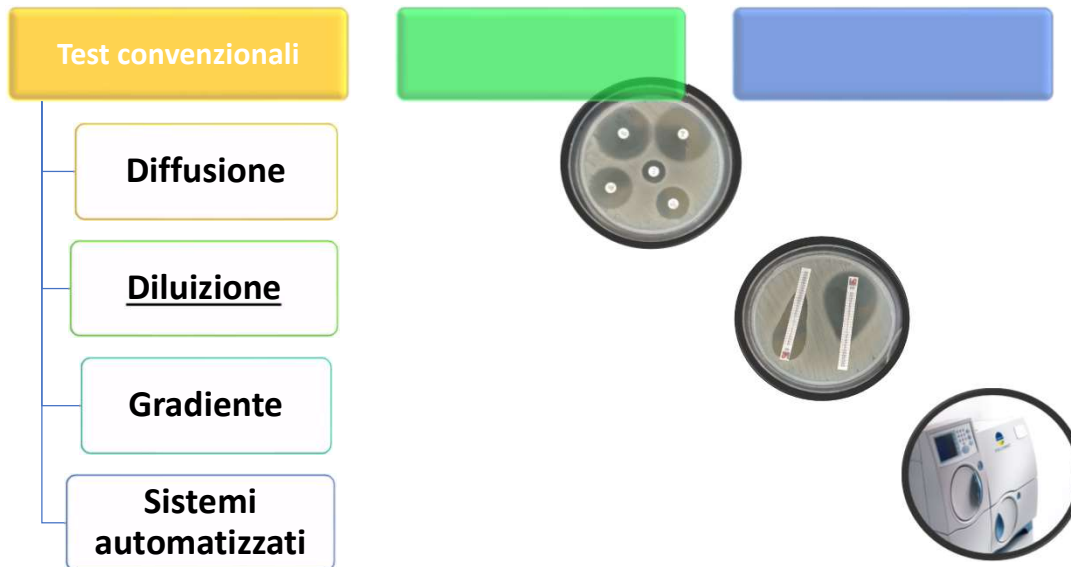
3

AST in med. veterinaria: la scelta del test



7

AST in med. veterinaria: la scelta del test fenotipico



8

4

AST in med. veterinaria: la scelta del test qualitativo (ADD)

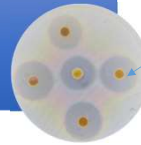
- Flessibile (atb vet.)
- Economico
- Facilità d'uso

VANTAGGI



- Tempistica
- Variabilità inoculo
- Lettura aloni (ricrescita)

SVANTAGGI



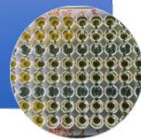
9

9

AST in med. veterinaria: la scelta del test quantitativo (MIC, E-test)

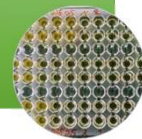
- Test commerciali
- MIC= gold standard
- Risultati quantitativi
- Facilità d'uso (E-test)
- Flessibili (atb vet)

VANTAGGI



- Tempistica
- Costi
- Se non automatizzati: complessità di esecuzione (MIC)

SVANTAGGI



10

10

5

AST in med. veterinaria: la scelta del test automatizzato

- Esecuzione semplice
- Sistema semi-quantitativo
- Elevato n. di atb testati
- Riduzione carico lavoro

vantaggi



- Elevato costo d'acquisto
- Antibiotici vet?
- Alcuni BP ottenuti per deduzione

svantaggi



11

11

AST in med. veterinaria: la scelta del test

Test convenzionali

Test biomolecolari

Spettrometria di massa

PCR

Maldi-Tof MS

Sequenziamento

NGS

Luminex



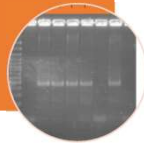
12

12

AST in med. veterinaria: la scelta del test genetico/genomico

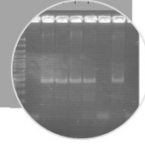
- Accurati
 - sensibili, riproducibili
- Tempistica
- Coltura-indipendenti

vantaggi



- Costo
- Spettro limitato
- Negatività \neq sensibilità fenotipica
- Positività \neq resistenza fenotipica

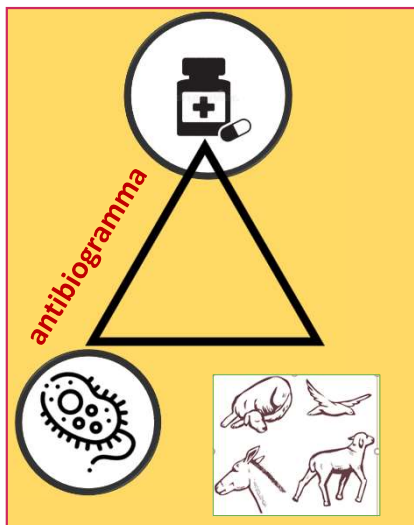
svantaggi



13

13

Quali resistenze ricercare negli animali? e come 'leggerle'?



AST genetici

AST fenotipici

14

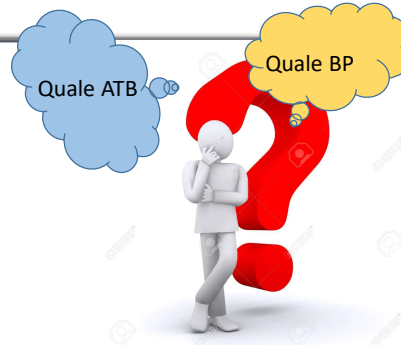
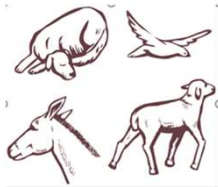
7

AST FENOTIPICO: *scelta degli antibiotici e refertazione*

Selezione degli antimicrobici più appropriati per i test di routine

Lettura & interpretazione

SEGNALAZIONE nel referto



15

15

AST FENOTIPICO: : *le linee guida*



• **EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ENOVAT

CLSI (NCCLS): Clinical and Laboratory Standards Institute

- SFM: Société Française de Microbiologie
- BSAC: British Society for Antimicrobial Chemotherapy
- MENSURA: Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobi

16

16

AST: la refe

Table 2B. *Pseudomonas aeruginosa* (Continued)

Test/Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL		
				S	I	R	S	I	R
Amnoglycosides/Aminocyclitols									
Dogs									
A		Amikacin	—	—	—	—	≤4	8	≥16
A		Gentamicin	10 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8
Horses (foals)									
A		Amikacin	—	—	—	—	≤2	4	≥8
Horses (adults)									
A		Amikacin	—	—	—	—	≤4	8	≥16
Horses									
		Gentamicin	10 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8
Humans									
		Amikacin	10 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
		Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16

akpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

Pseudomonas
Expert Rules and I

An MIC breakpoint of 1 mechanism to the ag

MIC determination (broth microdilution according to ISO standard 20776-1 except for fosfomycin where agar dilution is used)
Medium: Mueller-Hinton broth (for ceftiderocol, see https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/)
Inoculum: 5 × 10⁷ CFU/mL
Incubation: Sealed panels, air, 35±1°C, 18±2h
Reading: Unless otherwise stated, read MICs at the lowest concentration of the agent that completely inhibits visible growth. See "EUCAST Reading Guide for broth microdilution" for further information.
Quality control: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. For agents not covered by this strain and for control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor combinations, see EUCAST QC Tables.

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
Medium: Mueller-Hinton agar
Inoculum: MIC standard 5.5
Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h
Reading: Unless otherwise stated, read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background (illuminated with reflected light). See "EUCAST Reading Guide for disk diffusion" for further information.
Quality control: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. For agents not covered by this strain and for control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor-combination disks, see EUCAST QC Tables.

Pseudomonas aeruginosa is the most frequent species of this genus. Other less frequent *Pseudomonas* species recovered in clinical samples are: *P. fluorescens* group, *P. putida* group and *P. stutzeri* group.

Penicillins	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Benzylpenicillin	-	-	-	-	-	-	-	
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	
Amoxicillin-sulbactam	-	-	-	-	-	-	-	
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	-	
Amoxicillin-clavulanic acid	-	-	-	-	-	-	-	
Piperacillin	0.001	16	-	30	50	18	18-19	
Piperacillin-tazobactam	0.001	16	-	30-6	50	18	18-19	
Ticarcillin	0.001	16	-	75	50	18	-	
Ticarcillin-clavulanic acid	0.001	16	-	75-50	50	18	-	

Patrizia Nebbia

17

17

AST FENOTIPICO:
scelta degli antibiotici e refertazione

EMA Categorizzazione degli antibiotici destinati all'impiego negli animali per un uso prudente e responsabile

Categoria A

Evitare

- gli antibiotici di questa categoria non sono autorizzati come medicinali veterinari nell'UE
- non dovrebbero essere usati in animali destinati alla produzione alimentare
- possono essere somministrati agli animali da compagnia in circostanze eccezionali

Categoria C

Attenzione

- per gli antibiotici di questa categoria esistono alternative nella medicina umana
- per alcune indicazioni veterinarie, non sono disponibili alternative appartenenti alla categoria D
- dovrebbero essere presi in considerazione solo in assenza di antibiotici della categoria D che potrebbero essere clinicamente efficaci

Categoria B

Limitare

- gli antibiotici di questa categoria sono molto importanti nella medicina umana e l'uso negli animali dovrebbe essere limitato al fine di attenuare il rischio per la salute pubblica
- dovrebbero essere presi in considerazione solo quando non ci sono antibiotici delle categorie C o D che potrebbero essere clinicamente efficaci
- per quanto possibile, l'uso dovrebbe essere basato su esami di suscettibilità antimicrobica

Categoria D

Prudenza

- per quanto possibile, dovrebbero essere usati come trattamenti di prima linea
- come sempre, dovrebbero essere usati con prudenza, solo se necessario dal punto di vista medico

Per gli antibiotici di tutte le categorie

- si dovrebbero evitare l'uso non necessario, i periodi di trattamento eccessivamente lunghi e i sottodosaggi
- il trattamento di gruppo dovrebbe essere limitato a situazioni in cui non è fattibile un trattamento individuale
- consultare le linee guida della Commissione europea sull'uso prudente degli antibiotici negli animali: <https://bit.ly/2s7LUF2>

18

9

A	Aminopenicilline meropenem plimicillina	Carbapenemi meropenem doripenem	Medicinali usati solo per trattare la tubercolosi o altre malattie causate da micobatteri isoniazide etanbutolo pirazinamide etambutolo	Glicopeptidi vancomicina	EVITARE
	Ketolidi telitromicina	Lipopeptidi dalacinca	Altre cefalosporine e penemi (codice ATC J01D), comprese le combinazioni di cefalosporine di terza generazione con inibitori delle beta-lattamasi cefotribone ceftriazone ceftriazone-tazobactam cefepime	Gliciciclina tigeciclina	
	Monobattami aztreonam	Oxazolidinoni linezolid	Altri cefalosporine e penemi (codice ATC J01D), comprese le combinazioni di cefalosporine di terza generazione con inibitori delle beta-lattamasi cefotribone ceftriazone ceftriazone-tazobactam cefepime	Sostanze di recente autorizzazione nella medicina umana in seguito alla pubblicazione della classificazione ANEG da definire	
	Rifamicine (tranne rifaximina) rifampicina	Riminoenzime colistin	Chinoloni: fluorochinoloni e altri chinoloni cinovaxina danofloxacina ofloxacina enrofloxacina flumequina lofloxacin	Acidi pseudomonici mupirocina	
B	Carbospenicillina e uridopenicillina, comprese le combinazioni con inibitori delle beta-lattamasi piperacillina-tazobactam	Solfoni casopena		Sostanze di recente autorizzazione nella medicina umana in seguito alla pubblicazione della classificazione ANEG da definire	LIMITARE
	Cefalosporine di terza e quarta generazione con l'eccezione di combinazioni con inibitori delle beta-lattamasi cefoperazone cefotioxa cefquinoma cefzur	Polimixine colistina polimixina B			
C	Aminoglicosidi (tranne spectinomidina) amikacina aramina diidroestreptomicina framicina gentamicina kanamicina neomicina paromomicina streptomidina tobramicina	Aminopenicilline, in associazione con inibitori delle beta-lattamasi amoxicillina + acido clavulanico ampicillina + sulbactam	Amfenicoli ciprofloxacina florfenicolo temozanolo	Macrolidi eritromicina gambtromicina clarsidromina spiramicina clindamicina tilomicina klarmicina trivocina	ATTENZIONE
		Cefalosporine di prima e seconda generazione e cefamicine cefadossile cefepime cefepime cefotioxa ceftriazone ceftriazone	Lincomamidi clindamicina lincosamicina primidina	Rifamicine: solo rifaximina rifampicina	
D	Aminopenicilline, senza inibitori delle beta-lattamasi amoxicillina ampicillina metampicillina	Aminoglicosidi: solo spectinomidina	Sulfonamidi, inibitori della diidrofolato reductasi e combinazioni fosfotriazolo falsulfato sulfacetamide sulfadiazolo sulfadossina sulfafurazolo sulfamometoxina sulfametossidiazolo sulfamonicina sulfamometoxina sulfamerone sulfamossolone sulfatiazolo sulfazotiazolo sulfisozalazolo sulfisozalazolo		PRUDENZA
	Tetracicline clortetraciclina doxiciclina oxitetraciclina tetraciclina	Penicilline anti-stafilococciche (penicillina beta-lattamasi resistenti) cloxaciclina dicloxaciclina nafcillina oxaciclina			
	Penicilline naturali, a spettro ristretto (penicilline sensibili alle beta-lattamasi) benzilpenicillina benzatrica fenossimetilpenicillina benzatrica benzpenicillina penamato idrato	Penicilline anti-stafilococciche (penicillina beta-lattamasi resistenti) cloxaciclina dicloxaciclina nafcillina oxaciclina	Polipeptidi ciclici bacitracina	Nitroimidazoli metronidazolo	
			Antibatterici steroidei acido fusidico	Derivati nitrofurantici furazolidone furazolidone	

19

AST in med. veterinaria: Valutazione della multi-resistenza

> Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27.

Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance

A-P Magiorakos¹, A Srinivasan, R B Carey, Y Carmeli, M E Falagas, C G Giske, S Harbarth, J F Hindler, G Kahnmeter, B Olsson-Liljequist, D L Paterson, L B Rice, J Stelling, M J Struelens, A Vatopoulos, J T Weber, D L Monnet

Med. umana

- *S. aureus*
- 17 categorie

Med. Vet ?

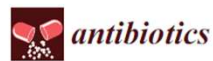
- *Staphylococcus. spp.*
- 6 categorie
- Cute/tessuti molli

20

20

10

valutazione antibioticoresistenza in un patogeno di interesse veterinario: *Staphylococcus pseudintermedius*



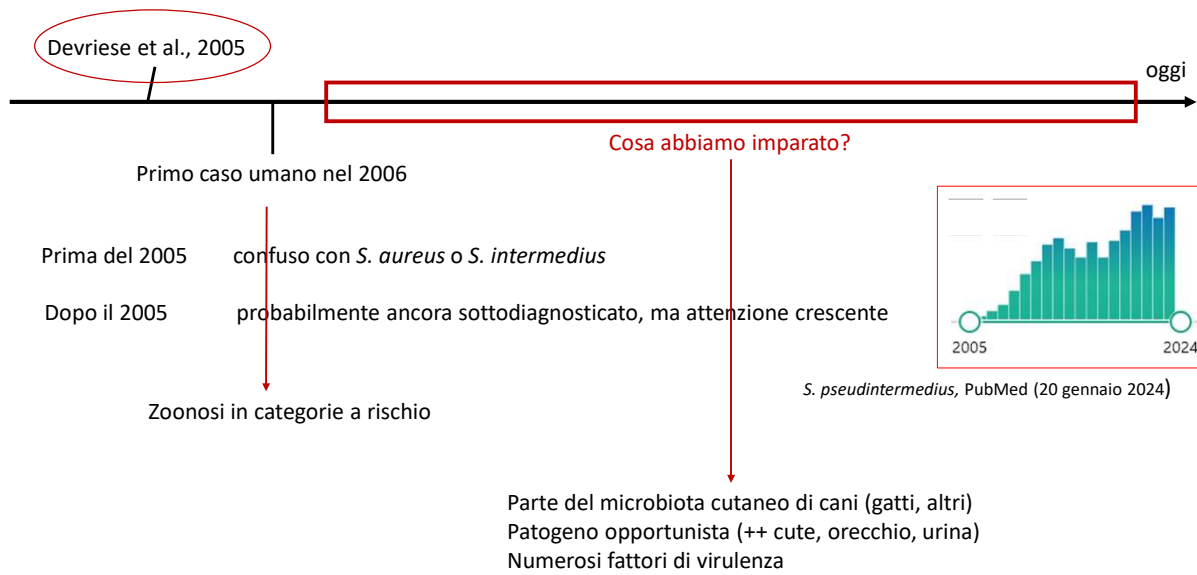
Article

Resistance to Critical Important Antibacterials in *Staphylococcus pseudintermedius* Strains of Veterinary Origin

Alessandro Bellato , Patrizia Robino, Maria Cristina Stella , Laura Scarrone, Daniela Scalas and Patrizia Nebbia

21

Staphylococcus pseudintermedius



22

11

Perché monitorare *S. pseudintermedius*?

Pathogenic factors	Function in pathogenesis	Present in <i>S. aureus</i>	Present in <i>S. pseudintermedius</i>
Enzymes • Coagulase • DNase • Lipase	• Converts fibrinogen to fibrin • Hydrolysis of DNA • Hydrolysis of lipids	Yes	Yes
Secreted toxins • Beta-hemolysin • P-V leucocidin	• RBC hemolysis • Lysis of leukocyte cells	Yes	Yes
Super antigens • Exfoliative toxins (SIET, EXI [ExpA], ExpB)	• Cytopathic effects on epithelial cells	Yes	Yes
Enterotoxin	• Food poisoning	Yes	Yes
CWA proteins • Protein A	• Helps in identification	Yes	Yes
Formation of biofilm	• Responsible for chronic infection and drug resistance	Yes	Yes

Fonte: Bhooshan et al., 2020

Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases

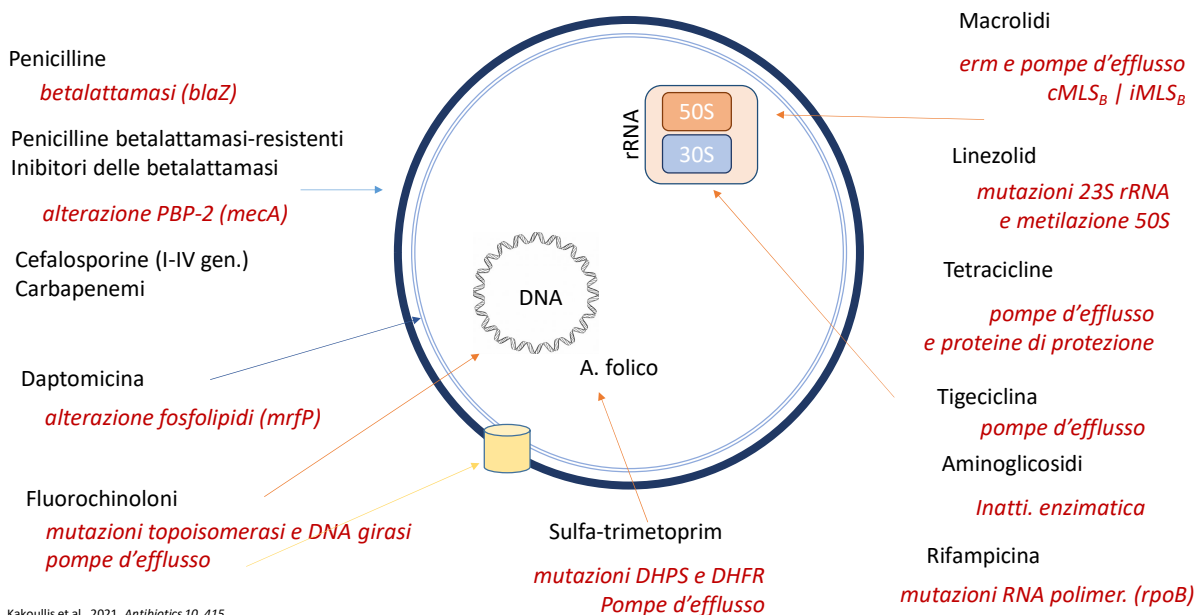
R Somayaji¹, M A R Priyantha², J E Rubin², D Church³



Bierowiec et al., 2019

23

Antibiotici e resistenza in *Staphylococcus* spp.



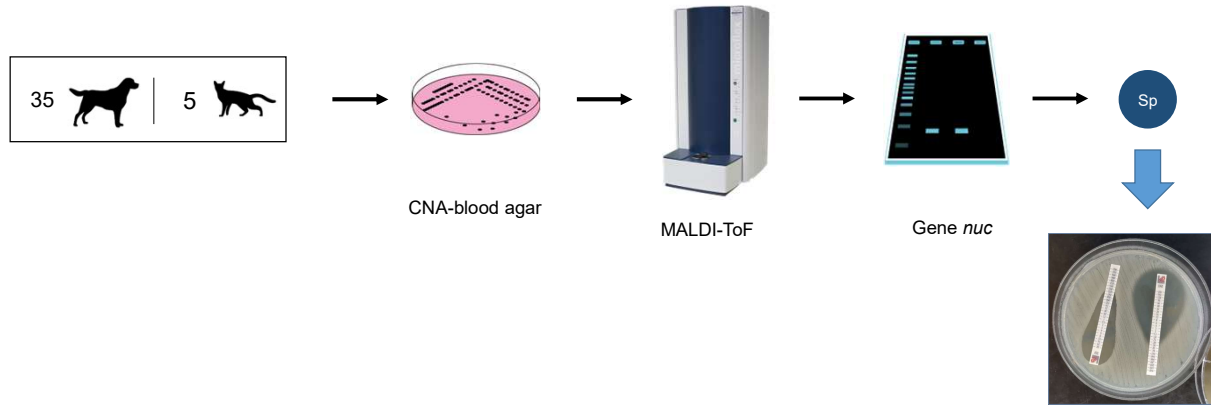
Kakoullis et al., 2021. *Antibiotics* 10, 415.

24

12

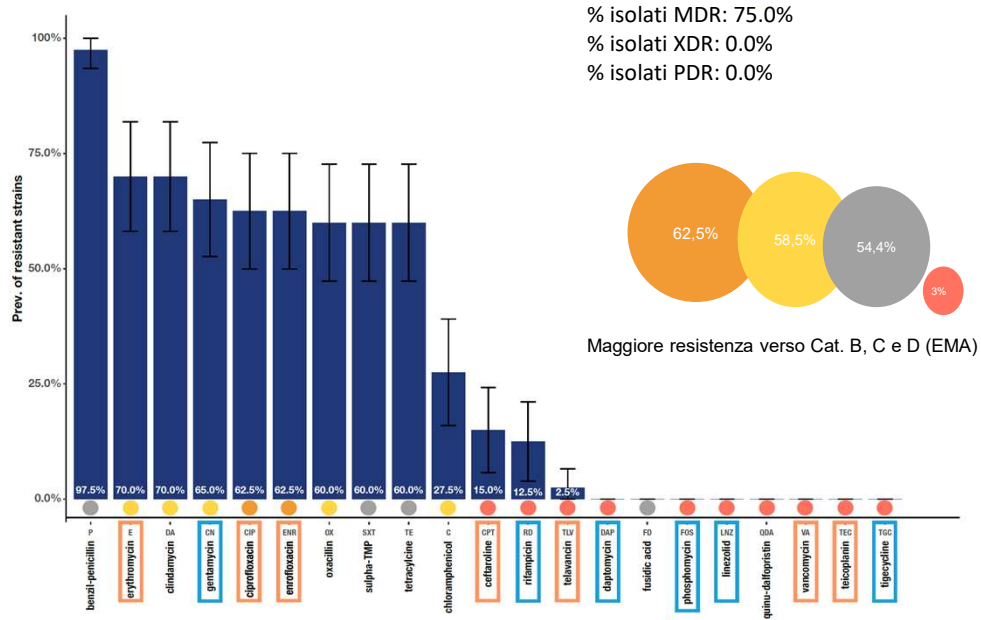
I casi all'OVU di Torino

Reason for admission	Freq. (%)
Orthopaedic surgery	21 (52.5%)
Dermatitis	9 (22.5%)
Soft-tissue surgery	5 (12.5%)
Urinary tract infection	5 (12.5%)
Total	40



25

Risultati



26

CSQA		Università degli Studi di Torino Struttura Didattica Speciale Veterinaria Direttore: Prof. Bruno Peirone Ospedale Veterinario Universitario Direttore: Prof. Ada Rota LARGO P. BRACCINI, 2 10095 GRUGLIASCO Cod. fisc. 80088230018-P.IVA 02099550010		CSQA	
Richiesta n°: 216232	Specie: CANE	Segnalato il: 16/01/2024			
Proprietario: POLIZIA MUNICIPALE DI TORINO	Razza: BELGIAN MALINOIS	Veterinario referente: Ferraris Erica Italia			
Animale: FRIDA	Età: 7 anni 10 mesi				
Nome ufficiale:	Microchip: None				
	Codice destinatario:				
Finale Rapporto di microbiologia					
Risultati					
Nome	Campione				
generico: es. colt+ antibiog	#47731 Altro - raccolta di liquido sieroso emorragico a livello dell'articolazione del carpo				
Esito	Descrizione				
Staphylococcus pseudintermedius					
Antibiotico	Resistente	Intermedio	Sensibile	KB	
Acido Fusidico			✓		
Amikacina			✓		
Amoxicillina	✓				
Amoxicillina/Acido Clavulanico			✓		
Cefalexina			✓		
Cefalosporina			✓		
Cefazolin			✓		
Cefepime			✓		
Cefovecina			✓		
Cefotaxima			✓		
Ceftazidime			✓		
Cloxacilina			✓		
Cloxacilina/Meclociclina			✓		
Cloramfenicolo			✓		
Ciprofloxacina			✓		
Enterochinina			✓		
Gentamicina			✓		
Marbofloxacina			✓		
Nitrofurantoina			non testato		
Penicillina	✓				
Ritampicina			✓		
Tetracicclina			✓		
Trimetoprim/Sulfametossazolo			✓		

CSQA		Università degli Studi di Torino Struttura Didattica Speciale Veterinaria Direttore: Prof. Bruno Peirone Ospedale Veterinario Universitario Direttore: Prof. Ada Rota LARGO P. BRACCINI, 2 10095 GRUGLIASCO Cod. fisc. 80088230018-P.IVA 02099550010		CSQA	
Richiesta n°: 215063	Specie: CANE	Segnalato il: 28/11/2023			
Proprietario: ELLENA JEAN MARIE JOSEPH	Razza: METICCIO	Veterinario referente: Peirone Bruno			
Animale: MAX	Età: 2 anni 0 mesi				
Nome ufficiale:	Microchip: 3852605044827320				
	Codice destinatario:				
Finale Rapporto di microbiologia					
Risultati					
Nome	Campione				
generico: es. colt+ antibiog	#46530				
Esito	Descrizione				
Staphylococcus pseudintermedius					
Antibiotico	Resistente	Intermedio	Sensibile	KB	
Acido Fusidico	✓				
Amikacina			✓		
Amoxicillina	✓				
Amoxicillina/Acido Clavulanico	✓				
Cefalexina	✓				
Cefalosporina	✓				
Cefazolin	✓				
Cefepime	✓				
Cefovecina	✓				
Cefotaxima	✓				
Ceftazidime	✓				
Cloxacilina	✓				
Cloxacilina/Meclociclina	✓				
Cloramfenicolo	✓				
Ciprofloxacina	✓				
Enterochinina	✓				
Gentamicina	✓				
Marbofloxacina	✓				
Nitrofurantoina	✓				
Penicillina	✓				
Ritampicina	✓				
Tetracicclina	✓				
Trimetoprim/Sulfametossazolo	✓				

27

Bibliografia/sitografia consultata

CLSI, VET08 (2018). Performance standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility test for bacteria isolated from animals. 4th ed.

<http://eucaast.org>

<http://www.izslt.it/crab>

<https://www.izsvnezie.it/documenti/servizi/informazioni-general/linee-guida-mic.pdf>

<https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/antimicrobial-resistance-veterinary-medicine/advice-impacts-using-antimicrobials-animals#related-information-materials-section>

*grazie per la
vostra
attenzione*

28

14