

Antibiogramma fenotipico e molecolare con casi clinici

Bruno Viaggi

*Dipartimento di Anestesia
SOD Neuroanestesia e Rianimazione
A.O.U. Careggi, Firenze*



Gian Maria Rossolini

*Dip. Medicina Sperimentale e Clinica
Università di Firenze
SOD Microbiologia e Virologia
A.O.U. Careggi, Firenze*

**Meeting
Antibiotic
Stewardship**

30 - 31 Maggio 2018, Ranica
Istituto di Ricerche
Farmacologiche Mario Negri



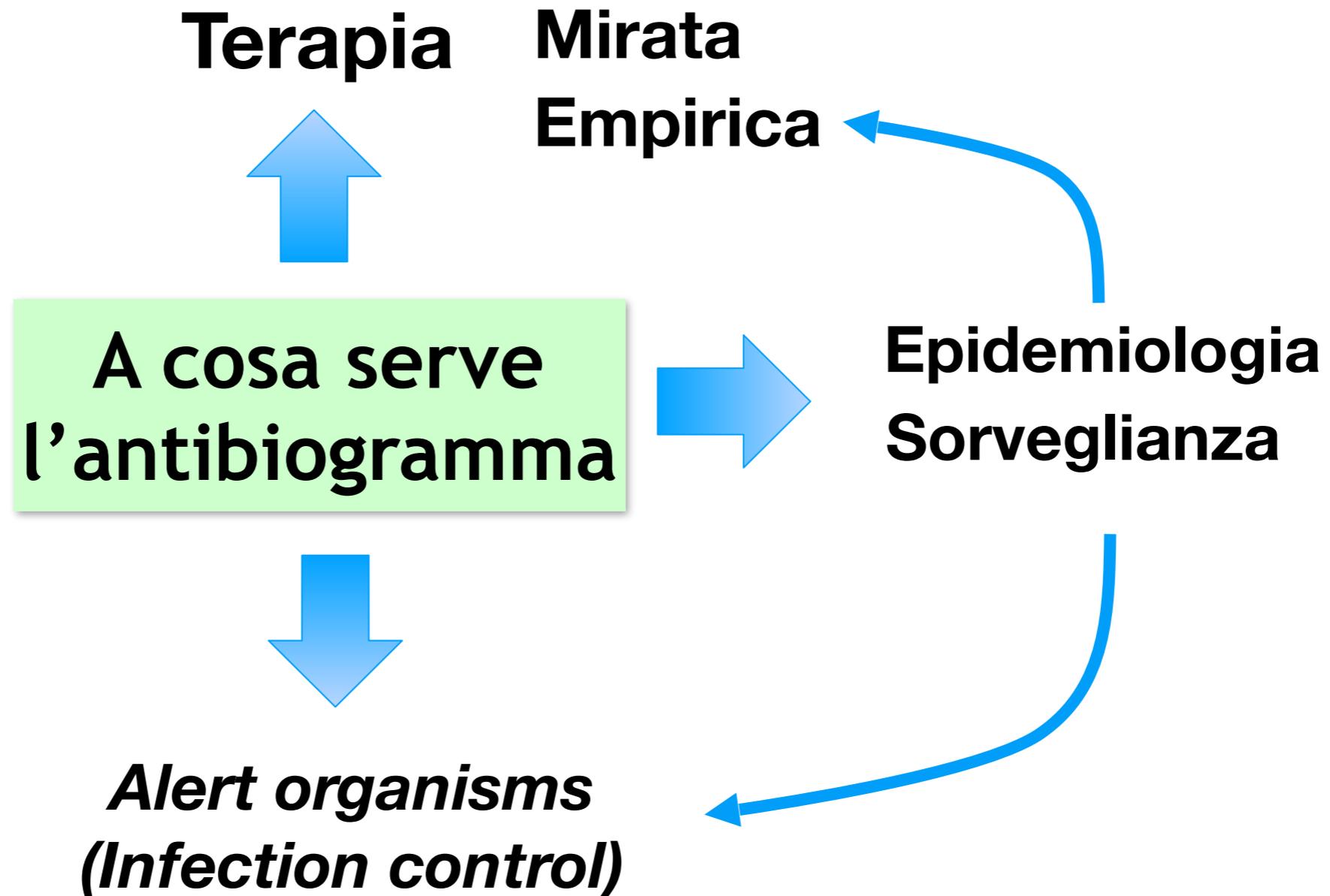
Dichiarazione su potenziali conflitti di interesse

Consulenze, partecipazione advisory boards, speaker's bureau, contratti/contributi di ricerca e di eventi studio:
Abbott, Accelerate Diagnostics, Ada, Alifax, Angelini, Becton Dickinson, Bellco, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Thermofischer Scientific

Dichiarazione su potenziali conflitti di interesse

Consulenze, partecipazione advisory boards, speaker's bureau, contratti e contributi di ricerca, travel grants:
Accelerate, Achaogen, Alifax, Angelini ACRAF, Astra Zeneca, Basilea, Beckman Coulter, Becton-Dickinson, bioMérieux, Biotest, Cepheid, Checkpoints, Curetis, DID Diagnostics, Elitech, Merck, Menarini, Nordic Pharma, Novartis, Pfizer, Rempex-TMCo, Seegene, Shionogi, ThermoFisher, Zambon

- 80-90% delle **comunicazioni tra Microbiologo Clinico e Utente** riguarda dati relativi ai saggi di sensibilità agli antibiotici



- L'**utilità dell'antibiogramma aumenta con la diffusione delle resistenze**

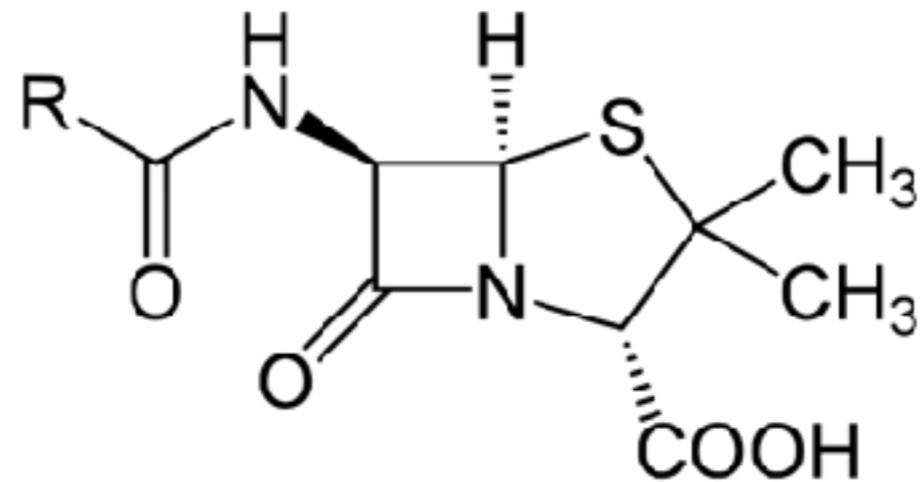
Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy

Alasdair P. MacGowan^{1,2*} on behalf of the BSAC Working Parties on Resistance Surveillance

Significative evidenze a supporto del valore predittivo dell'antibiogramma ai fini dell'outcome clinico

Nelle infezioni gravi (e. g. BSI, polmoniti) ma anche nelle infezioni comunitarie (e. g. UTI), e per infezioni causate da specifici patogeni (e. g. ESBL, *Pseudomonas*)

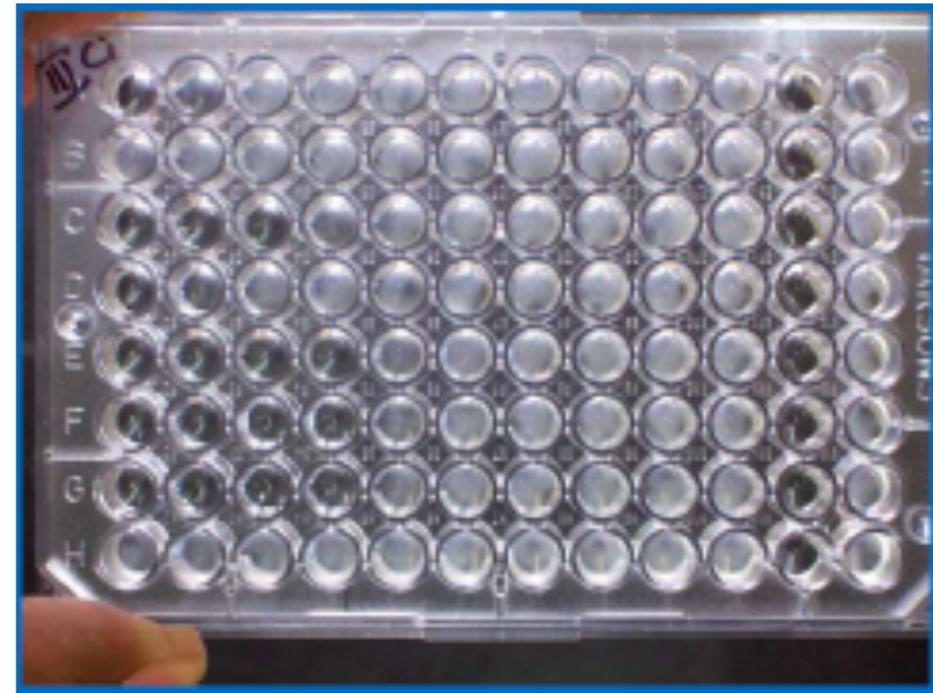
Negli studi clinici, il principale criterio per definire adeguatezza delle terapie antibiotiche è basato sull'antibiogramma



The discovery of penicillin

Necessità di misurare l'attività degli antibiotici nei confronti delle varie specie batteriche in condizioni standardizzate

Concentrazioni scalari di antibiotico



MIC = Minimum Inhibitory Concentration

La MIC

✓ Parametro che nasce per misurare l'attività in vitro degli antibiotici in condizioni standardizzate

✓ Uso come proxy per valutare l'efficacia clinica di un antibiotico



*Necessità di riferimento interpretativo
(breakpoints clinici → S/I/R)*

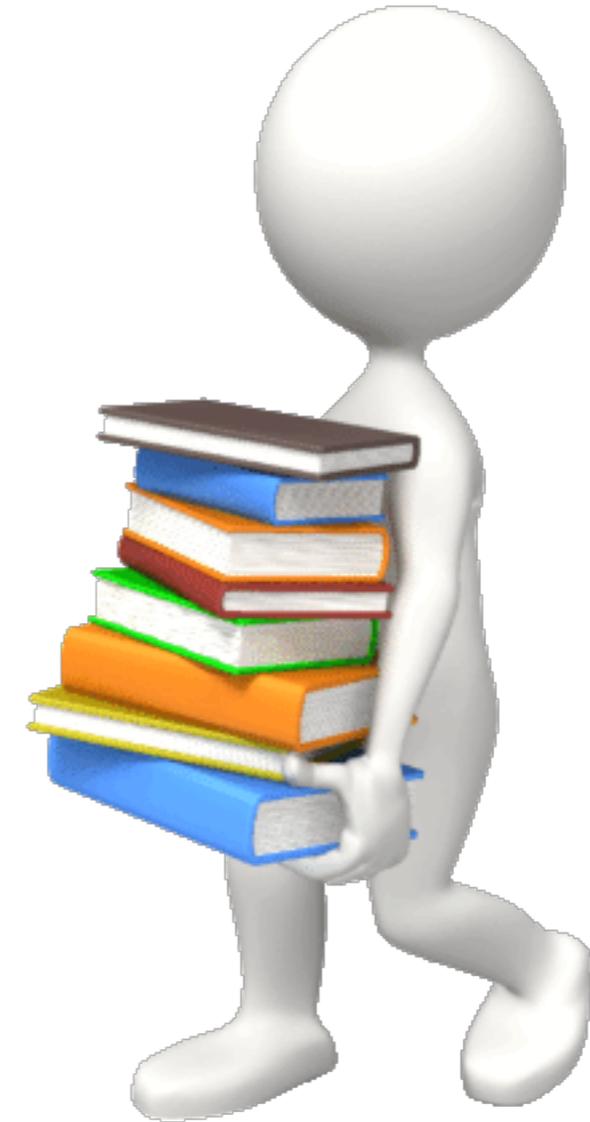


www.eucast.org

The screenshot shows the homepage of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The browser address bar displays "http://www.eucast.org/". The page features a navigation menu with "Home", "Contact", and "Sitemap". The main header includes the EUCAST logo and the text "EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING" and "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases". A sidebar on the left lists various sections: Organization, Clinical breakpoints, Expert rules, MIC - distributions and QC, Zone diameter distributions, EUCAST disk diffusion test, Frequently Asked Questions (FAQ), Meetings, EUCAST Presentations, Documents, and Information for industry. The main content area features a map of Europe and a search bar. The central heading reads "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST". Below this, a paragraph states: "EUCAST is a standing committee jointly organized by ESCMID, ECDC and European national breakpoint committees. EUCAST deals with breakpoints and technical aspects of phenotypic in vitro antimicrobial susceptibility testing and functions as the breakpoint committee of EMEA and ECDC." Another paragraph follows: "EUCAST does not deal with antibiotic policies, surveillance or containment of resistance or infection control." The text concludes with "The Steering Committee is the decision making body. It is supported by a". On the right, a "News" section lists updates: "New breakpoints for *Moraxella catarrhalis*" (update May 26, 2011), "Breakpoints for antifungals" (update April 28, 2011), "EUCAST presentation 2011" (update April 25, 2011), "*H. pylori* brpts (finalized 2011)", and "Preparedness of manufacturers" (update 2011-03-07).

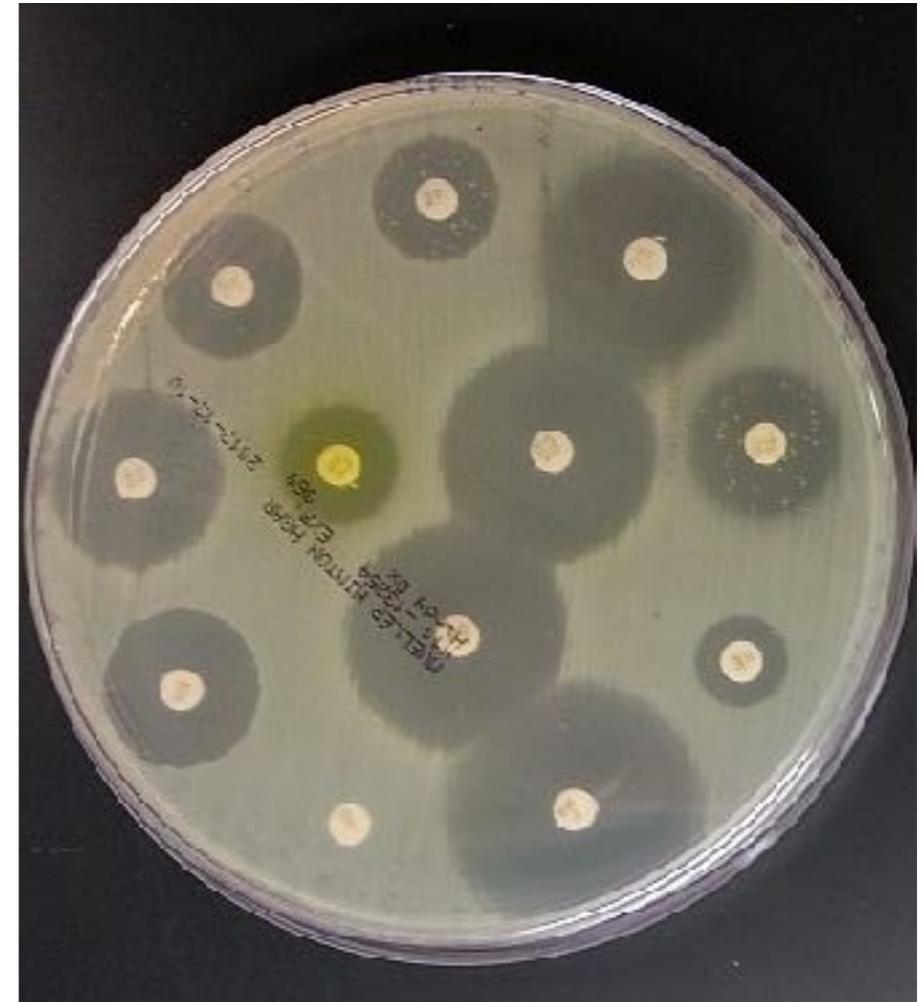
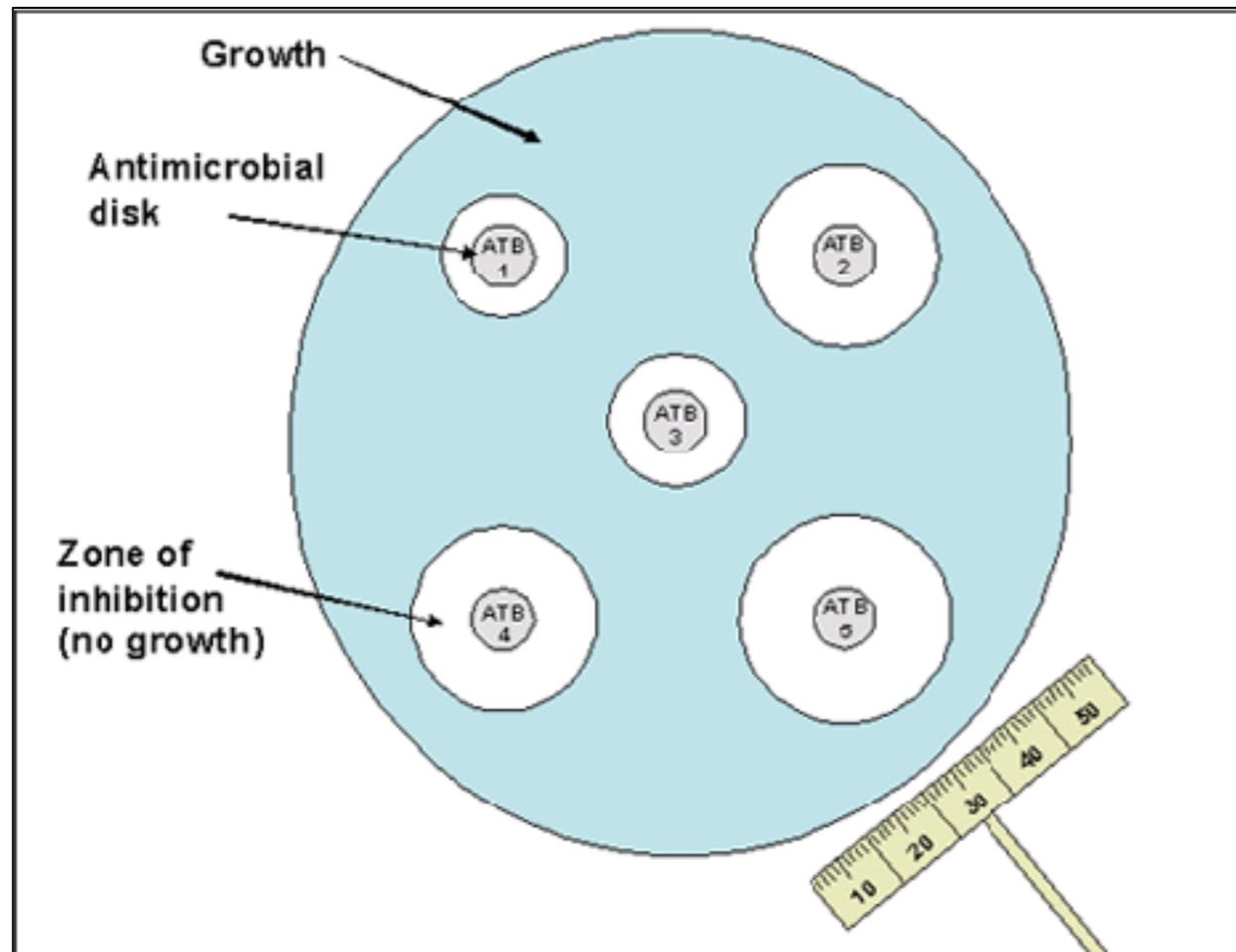
Pseudomonas spp.

Cephalosporins	MIC breakpoint (mg/L)	
	S ≤	R >
Cefaclor	-	-
Cefadroxil	-	-
Cefalexin	-	-
Cefazolin	-	-
Cefepime ¹	8	8
Cefixime	-	-
Cefotaxime	-	-
Cefoxitin	NA	NA
Cefpodoxime	-	-
Ceftaroline	-	-
Ceftazidime ²	8	8
Ceftazidime-avibactam, <i>P. aeruginosa</i>	8 ³	8 ³
Ceftibuten	-	-
Ceftobiprole	IE	IE
Ceftolozane-tazobactam, <i>P. aeruginosa</i>	4 ⁴	4 ⁴
Ceftriaxone	-	-
Cefuroxime iv	-	-
Cefuroxime oral	-	-



1. Breakpoints are based on high dose therapy, see table of dosages
2. Breakpoints are based on high dose therapy, see table of dosages
3. For susceptibility testing purposes, the concentration of avibactam is fixed at 4 mg/L.
4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.

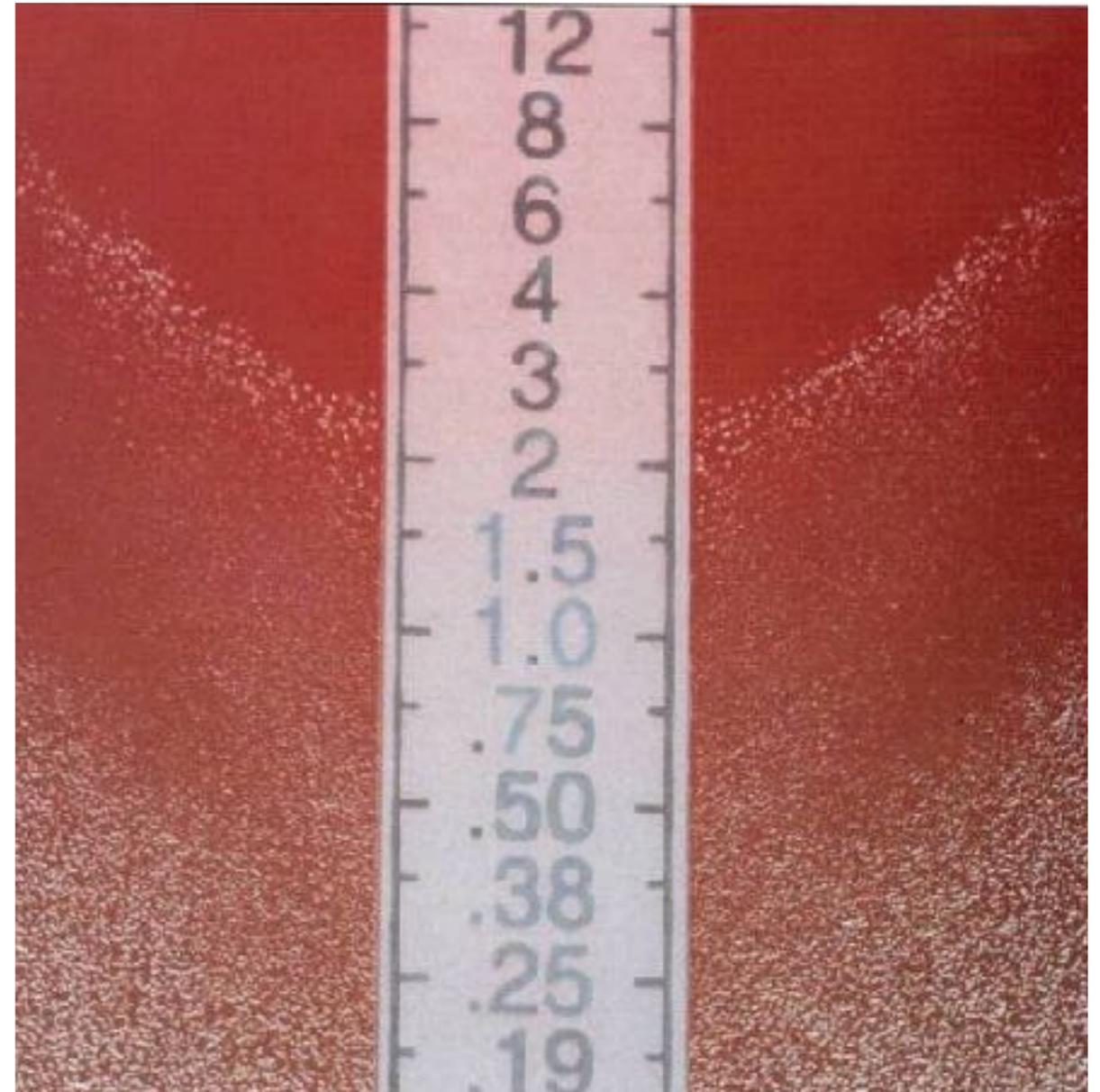
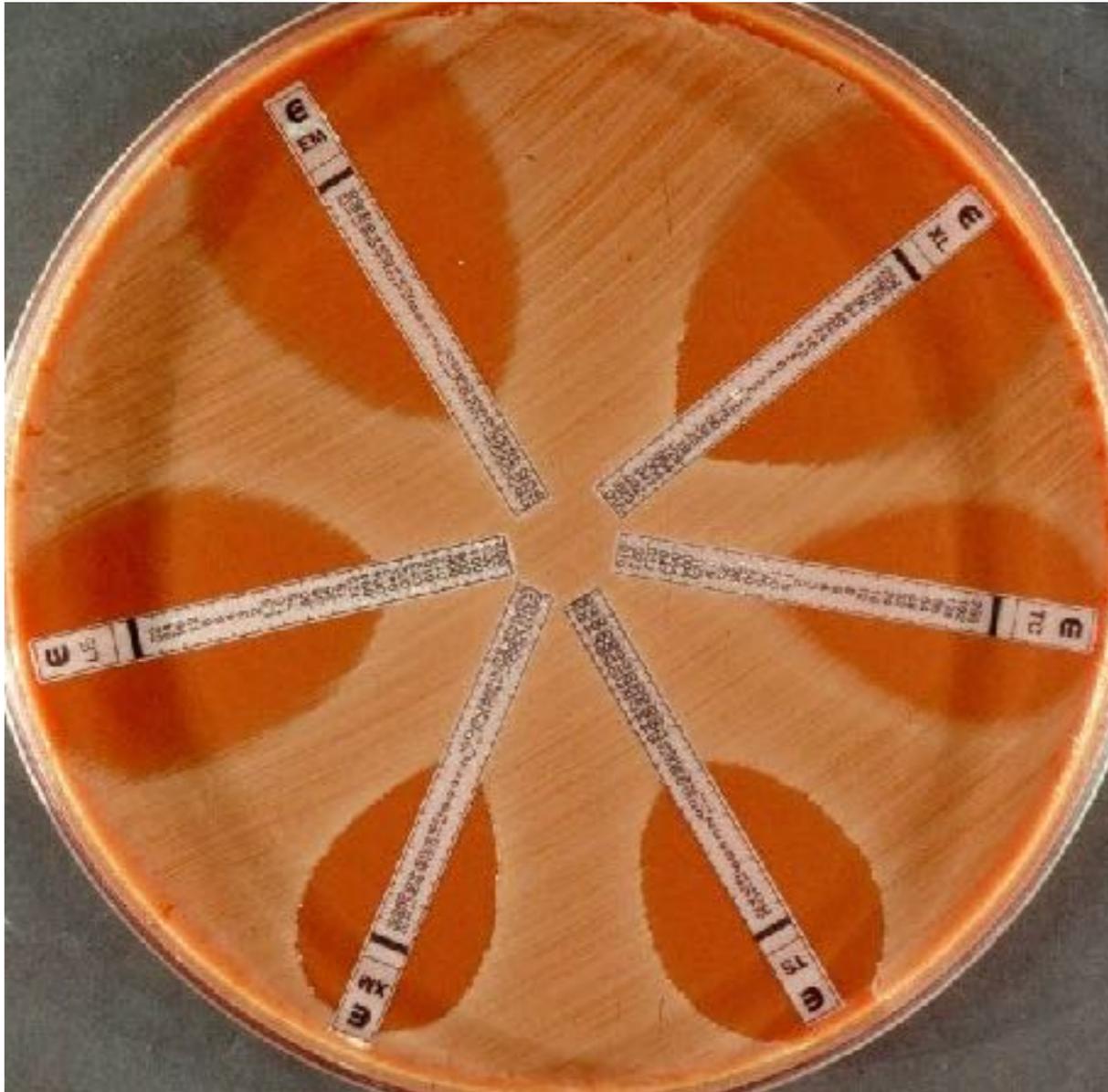
Saggio di sensibilità per disco-diffusione



Possibili limiti:

- *Riproducibilità diffusione dell'antibiotico nel terreno*

Saggio di sensibilità per diffusione in gradiente



Possibili limiti:

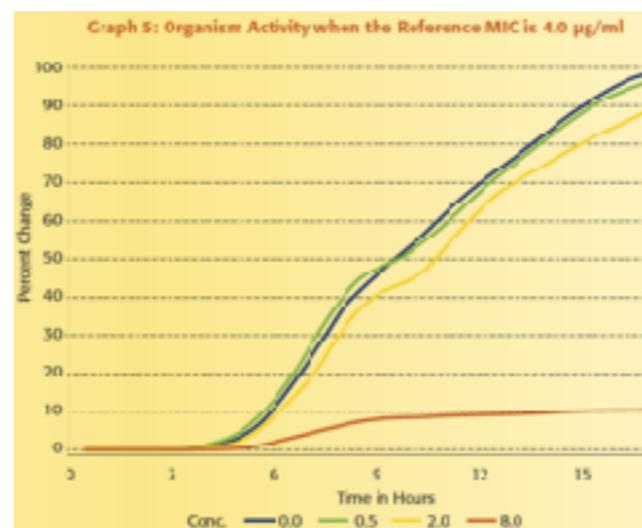
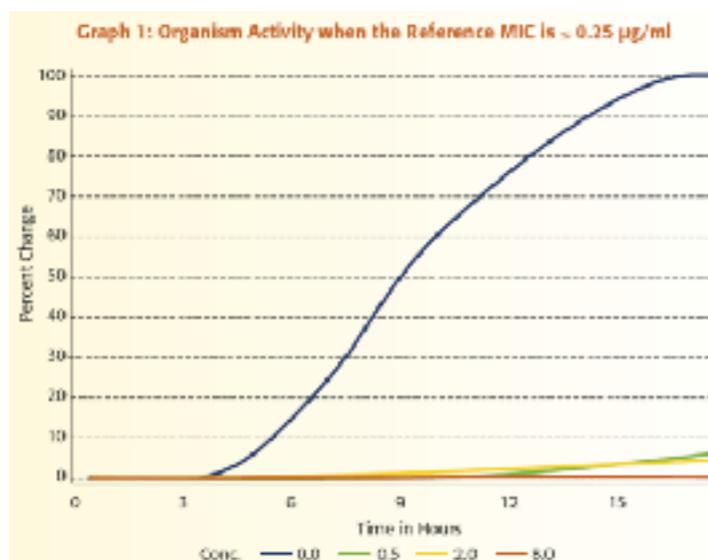
- *Riproducibilità diffusione dell'antibiotico nel terreno*
- *Riproducibilità calibrazione del gradiente*

Sistemi semi-automatici per l'esecuzione dell'antibiogramma



Possibili limiti:

- *Range di concentrazioni saggiate limitato*
- *Estrapolazione del valore di MIC*



Klebsiella pneumoniae

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Amoxi/Clav	>64 R
Pip/Tazo	>256 R
Ceftriaxone	>64 R
Ceftazidime	>64 R
Cefepime	>64 R
Ertapenem	>32 R
Imipenem	>32 R
Meropenem	>32 R
Fosfomicina	>128 R
Amikacina	>64 R
Gentamicina	4 I
TMP/SXT	>320 R
Ciprofloxacina	>4 R
Tigeciclina	4 R
Colistina	>8 R

PDR

Stesso ceppo

Saggiato con sistema automatico



Saggiato con BMD e AD (fosfo)



Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Amoxi/Clav	>64 R
Pip/Tazo	>256 R
Ceftriaxone	>64 R
Ceftazidime	>64 R
Cefepime	>64 R
Ertapenem	>32 R
Imipenem	>32 R
Meropenem	>32 R
Fosfomicina	32 S
Amikacina	>64 R
Gentamicina	2 S
TMP/SXT	>320 R
Ciprofloxacina	>4 R
Tigeciclina	1 S
Colistina	>8 R

MDR

Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) problemi di accuratezza nei saggi di sensibilità

- ◇ Sovrastima MIC Tigecyclina e Gentamicina con Vitek 2
- ◇ Falsi sensibili a Gentamicina con Vitek 2 (per ceppi ST101 ArmA+)
- ◇ Falsi sensibili a colistina con Etest
- ◇ Falsi sensibili / resistenti ai carbapenemi a seconda della metodica

Zarkotou et al – JCM 2012

Arena et al – DMID 2014

Dafopoulou et al – AAC 2016

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

- Usare **ISO-standard BMD** (con colistina solfato)
- Sistemi BMD commerciali **OK**
- Disco-diffusione **NO**
- Diffusione in gradiente **NO (*falsi sensibili*)**
- Sistemi semiautomatici **NO (*non estesamente validati*)**

Enterobatteri produttori di carbapenemase (CPE) problemi di accuratezza nei saggi di sensibilità

- ◇ Sovrastima MIC Tige e Genta con Vitek 2
- ◇ Falsi sensibili a Genta con Vitek 2 (per ceppi ST101 ArmA+)
- ◇ Falsi sensibili a colistina con Etest
- ◇ Falsi sensibili / resistenti ai carbapenemi a seconda della metodica
- ◇ Falsi sensibili / resistenti a fosfomicina a seconda della metodica

Saggi di sensibilità e nuovi antibiotici

- I nuovi antibiotici non sono ancora disponibili nella maggior parte dei sistemi semi-automatici
- Disponibilità di pannelli commerciali per BMD (ma lavoro e costo aggiuntivo)
- Disponibilità di strisce per diffusione in gradiente, ma possibili problemi di accuratezza

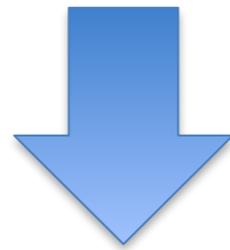
Comparison of Etest to Broth Microdilution for Testing of Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Ceftolozane-Tazobactam

Lauren K. Flynt,^a Michael P. Veve,^{a,b} Linoj P. Samuel,^a Robert J. Tibbetts^a

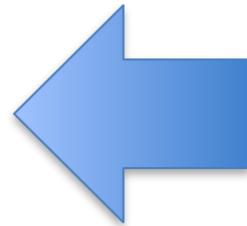
N=90 meropenem-NS *P. aeruginosa* isolates from various clinical specimens (12 resistant to CTZ-TAZ)

Categorical agreement, 89%
Essential agreement 76%
False resistant, 3%
False susceptible, 50%

Problemi di accuratezza dei saggi di sensibilità con alcuni sistemi per i batteri MDR



**Impatto su
*stewardship***



**Impatto su
dati di
sorveglianza**

La responsabilità dell'accuratezza del dato di sensibilità è del laboratorio

Utilità di conoscere i problemi e dialogare con il laboratorio per conoscere il tipo di sistema utilizzato e i suoi limiti

Paziente: Xxxxxxx Xxxxxxx

Reparto: Xxxxxxx

Campione: BAL

ID: Staphylococcus aureus (>10⁵ CFU/mL)

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Cefoxitin screen	POS
Oxacillina	>4 R
Penicillina G	>0.25 R
Eritromicina	>2 R
Clindamicina	>0.5 R
Linezolid	2 S
Vancomicina	1 S
Rifampicina	0.03 S
Cotrimossazolo	<1 S

Sei soddisfatto di questo pannello di antibiotici?

Scelta degli antibiotici da saggiare



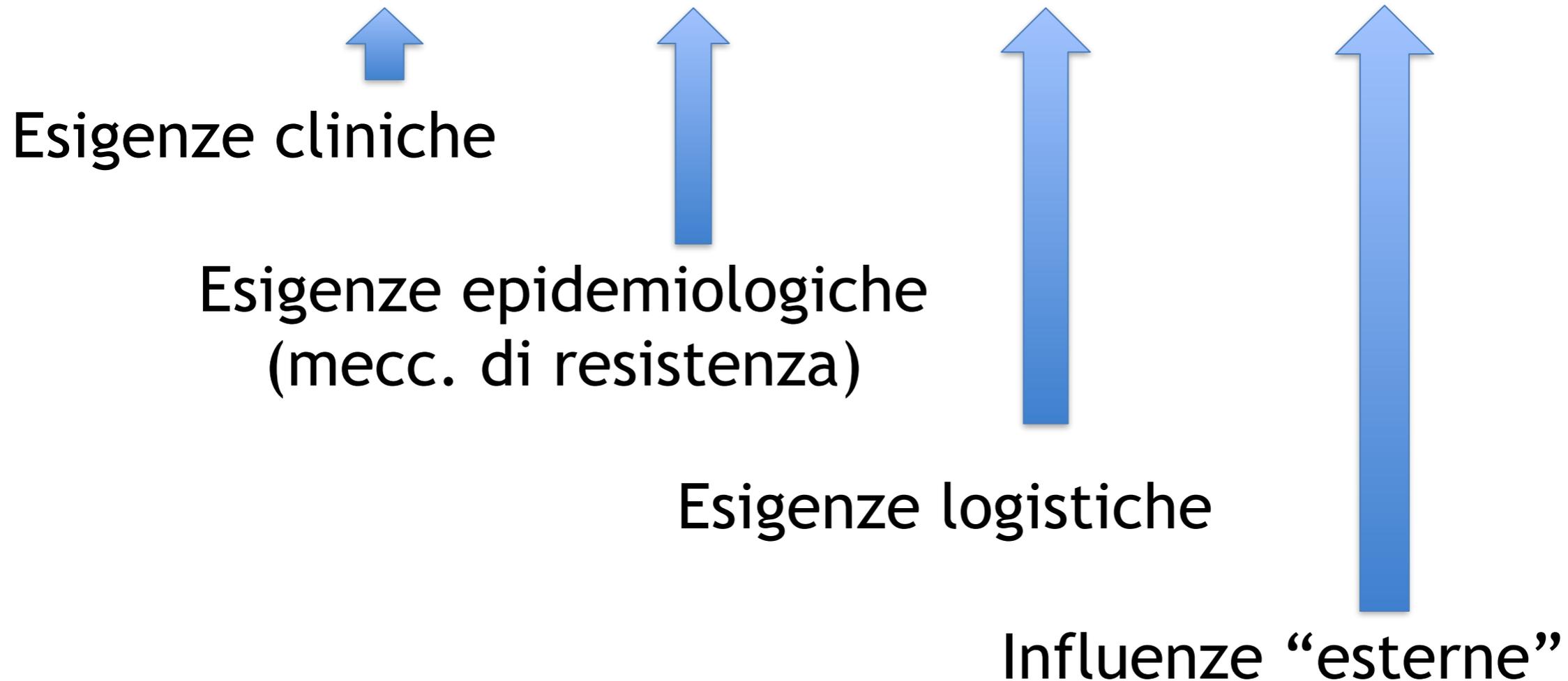
Gruppo A – Primary test and report

Gruppo B – Optional primary test (report selectively)

Gruppo C – Supplemental (report selectively)

Costruzione dell'antibiogramma

○ **Scelta degli antibiotici da saggiare**



Costruzione dell'antibiogramma

- Scelta degli antibiotici da saggiare
- Scelta degli antibiotici da refertare



Razionale della refertazione selettiva

- Orientare verso gli antibiotici più appropriati in relazione al microrganismo e alla sede di infezione
- Limitare il consumo di molecole ad ampio spettro e contenere l'insorgenza di antibiotico-resistenze
- Diminuire il consumo di antibiotici a maggior costo

POSSIBILI REGOLE DI REFERTAZIONE SELETTIVA

IN RELAZIONE AL PAZIENTE

IN RELAZIONE ALLA SEDE DI INFEZIONE

IN RELAZIONE AL CONTESTO ASSISTENZIALE

*IN RELAZIONE AL
MICRORGANISMO E AL SUO
PROFILO DI SENSIBILITA'*



Problemi della refertazione selettiva

- Può essere attuata solo con un sistema informatico appositamente impostato
- Non deve sottrarre informazioni al sistema di sorveglianza delle antibioticoresistenze

Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America

Tamar F. Barlam,^{1,a} Sara E. Cosgrove,^{2,a} Lilian M. Abbo,³ Conan MacDougall,⁴ Audrey N. Schuetz,⁵ Edward J. Septimus,⁶ Arjun Srinivasan,⁷ Timothy H. Dellit,⁸ Yngve T. Falck-Ytter,⁹ Neil O. Fishman,¹⁰ Cindy W. Hamilton,¹¹ Timothy C. Jenkins,¹² Pamela A. Lipsett,¹³ Preeti N. Malani,¹⁴ Larissa S. May,¹⁵ Gregory J. Moran,¹⁶ Melinda M. Neuhauser,¹⁷ Jason G. Newland,¹⁸ Christopher A. Ohi,¹⁹ Matthew H. Samore,²⁰ Susan K. Seo,²¹ and Kavita K. Trivedi²²

XV. Should ASPs Work With the Microbiology Laboratory to Perform Selective or Cascade Reporting of Antibiotic Susceptibility Test Results?

Recommendation

16. We suggest selective and cascade reporting of antibiotics over reporting of all tested antibiotics (*weak recommendation, low-quality evidence*).

Comment: Although data are limited that demonstrate direct impact of those strategies on prescribing, some form of selective or cascaded reporting is reasonable. After implementation, ASPs should review prescribing to ensure there are no unintended consequences.



Costruzione dell'antibiogramma

- Scelta degli antibiotici da saggiare
- Scelta degli antibiotici da refertare

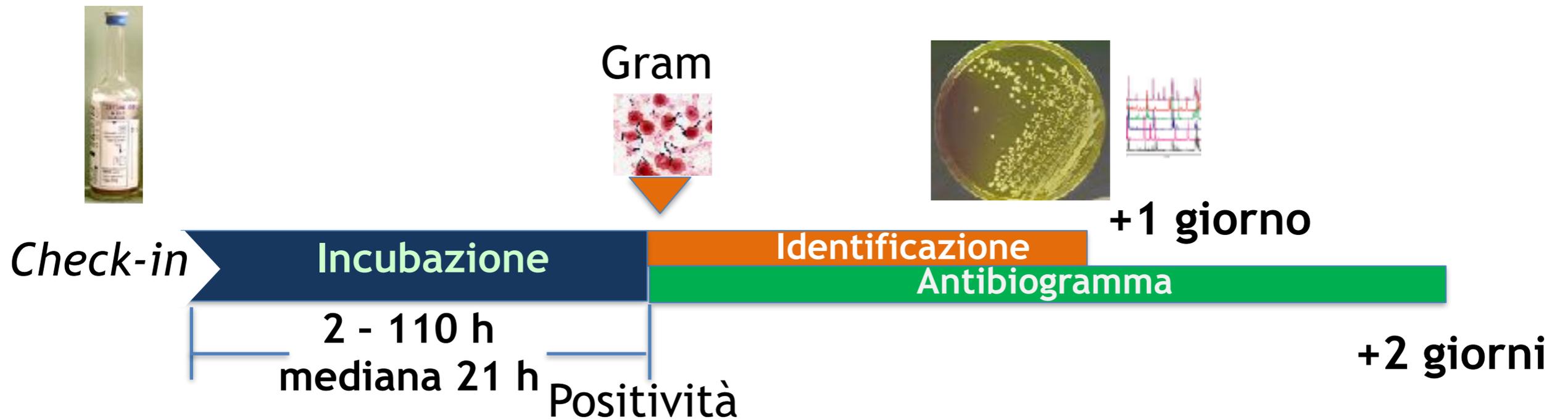
In un programma di *antimicrobial stewardship* la costruzione dell'antibiogramma deve essere condivisa tra tutti gli *stakeholders*

I limiti dell'antibiogramma convenzionale

- Possibile variabilità metodica-dipendente delle MIC
- Problemi di accuratezza con certe combinazioni molecole-patogeni
- Tempi di risposta lunghi (16-20 h)



Emocoltura: lo standard-of-care per la diagnostica microbiologica della sepsi



L'impatto è cresciuto con l'emergere delle multiresistenze

Impatto sulla *stewardship* antibiotica

Revisione

Revisione

Empirica

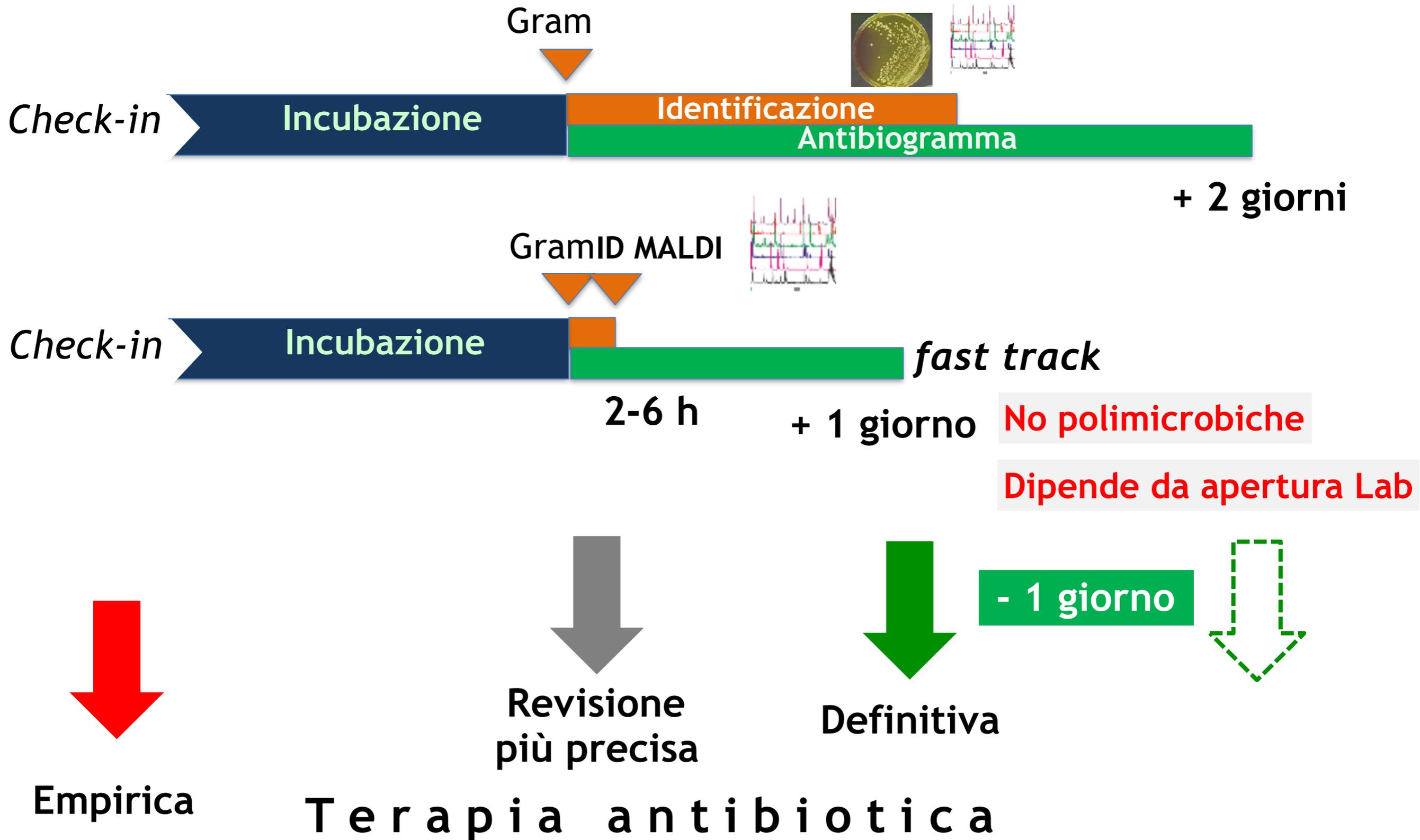
Terapia antibiotica

Definitiva

Come possiamo velocizzare l'antibiogramma?

- Intervento sul flusso di lavoro
- Antibiogramma rapido
- Antibiogramma molecolare

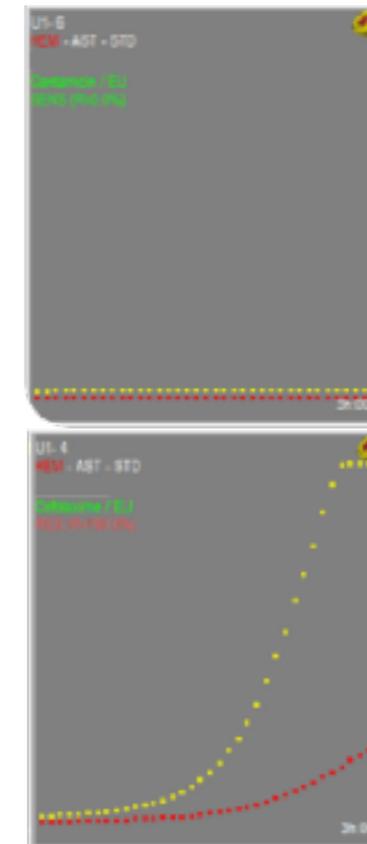
Velocizzare l'antibiogramma modificando il workflow



Antibiogramma rapido con tecnologia light scattering (LST)



Risultati in 4 - 6 h



Antibiogramma rapido in LST: impatto su antimicrobial stewardship

Sepsi in un paziente post-chirurgia addominale

Terapia empirica: PIP/TAZO + VANCO



Emocoltura positiva dopo 5 h (bacillo Gram-negativo)

- ID (MALDI da brodo eugonico): *Klebsiella pneumoniae* **3 h**
- AB rapido fenotipico con LST **6 h**



Cefotaxime	R
Pip/Tazo	R
Meropenem	R
Gentamicina	S
Colistina	S

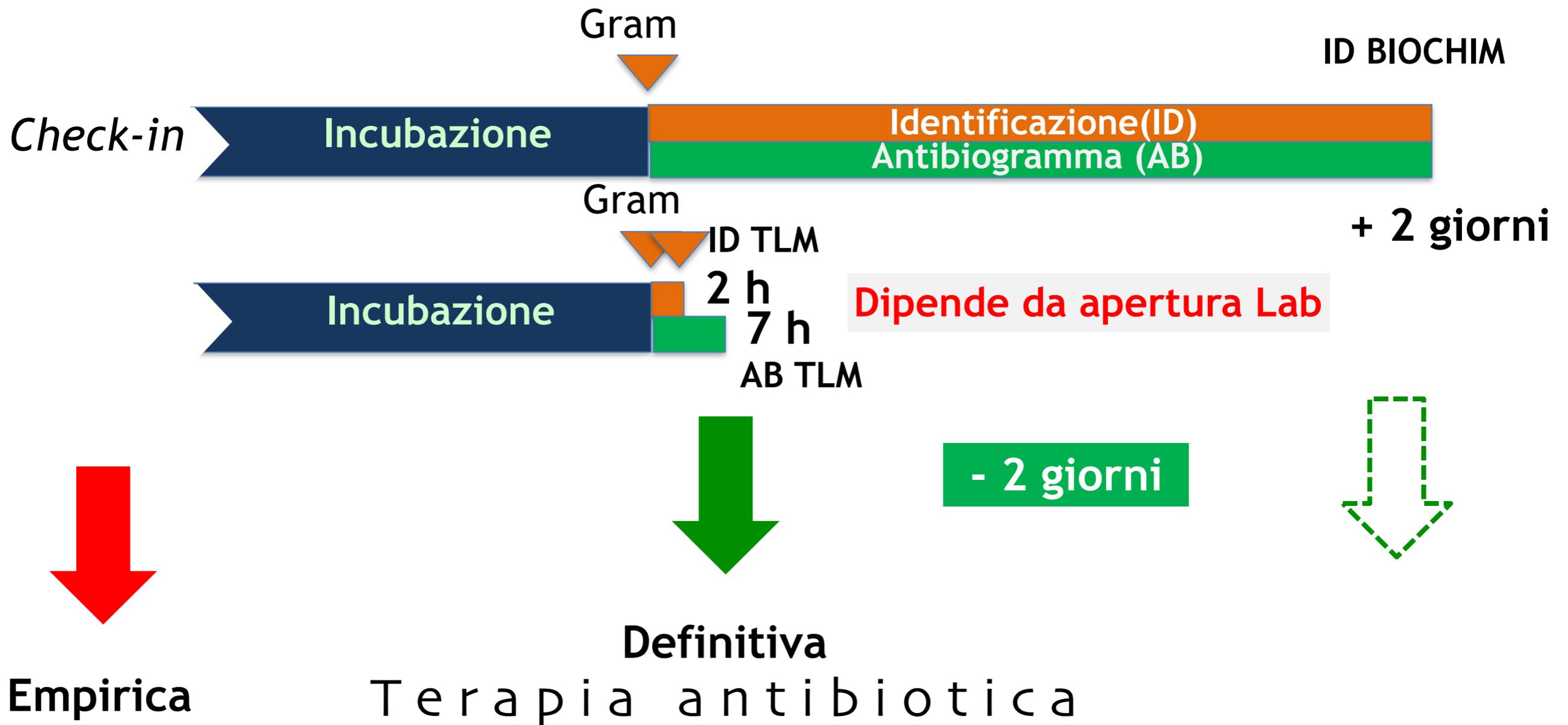
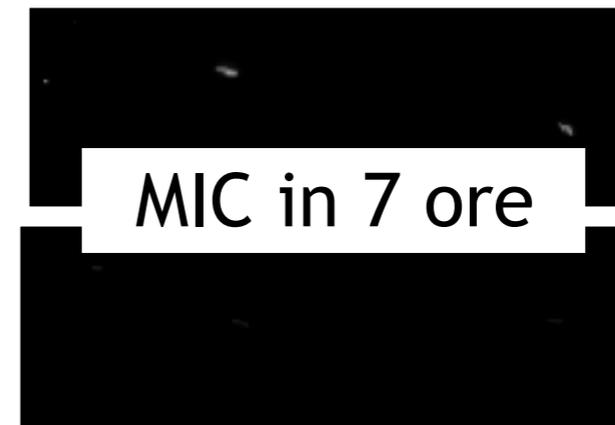
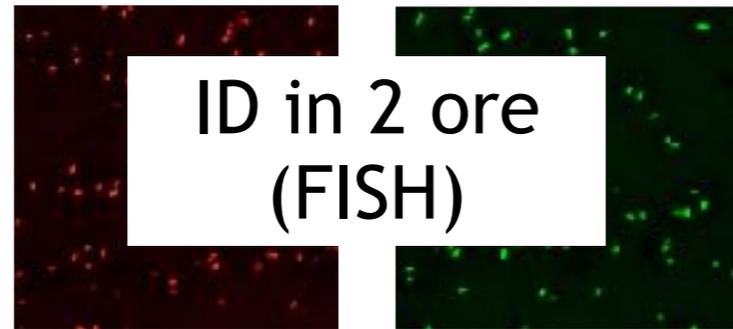
Mancano alcuni farmaci

Non misura le MIC

Revisione: upgrade a regime anti-CRE

Revisione terapeutica con anticipo di 1-2 giorni

Single Cell Automated Time-lapse Microscopy (TLM) per emocolture positive



ID e antibiogramma rapido con TLM: impatto su antimicrobial stewardship

Sepsi post-chirurgia addominale

Empirica: PIP/TAZO + VANCO



Emocoltura positiva dopo 5 ore



- ID: *Klebsiella pneumoniae* (1 h 41')
- AB (6 h 40')

Revisione: upgrade a regime anti-CRE

Revisione anticipata di 1-2 giorni

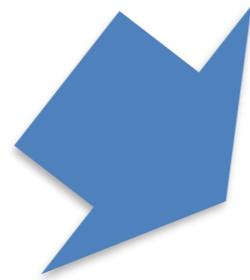
Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Cefazolina	≥32 R
Cefriaxone	≥8 R
Ceftazidime	≥32 R
Cefepime	≥32 R
Pip/Tazo	128 R
Ertapenem	2 R
Meropenem	≥8 R
Amikacina	≥64 R
Gentamicina	≤1 S
Ciprofloxacina	≥4 R
Colistina	≤0.5 S

Mancano alcuni farmaci

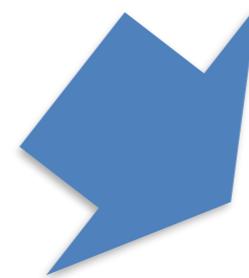
MIC meropenem non estesa

Antibiogramma molecolare

Rilevazione di marcatori molecolari (DNA o proteine) per meccanismi di resistenza



Informazione rapida su meccanismi di resistenza



Decisione terapeutica

Lateral flow immunochromatography assay (LFIA)

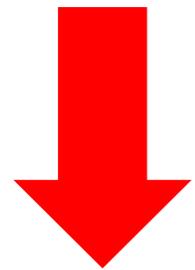
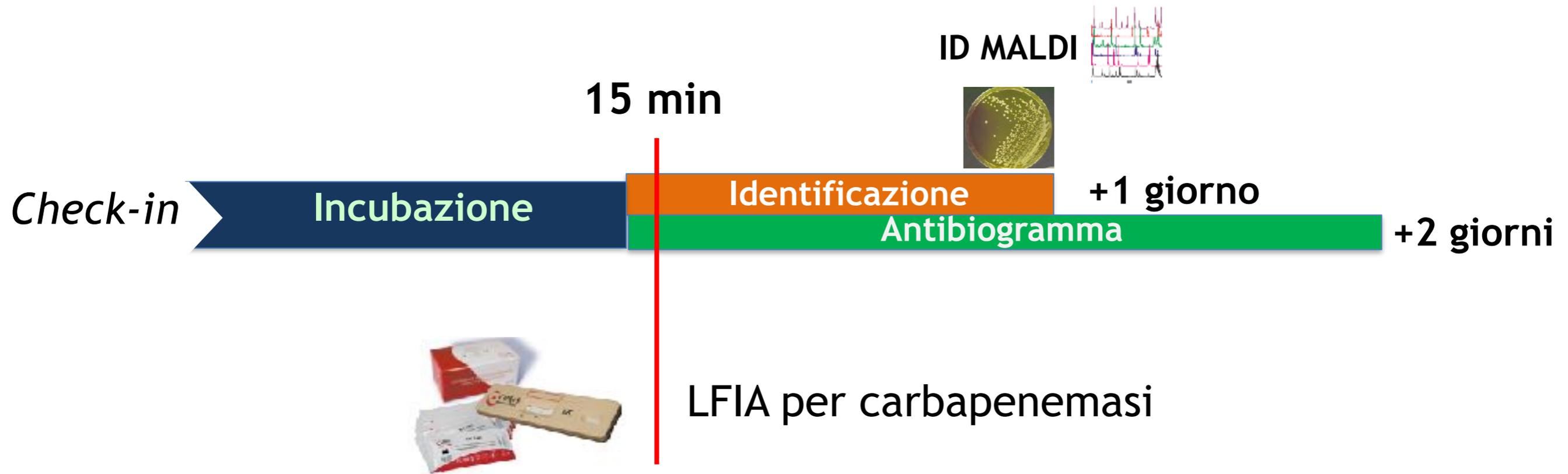
Lateral Flow Assay Architecture



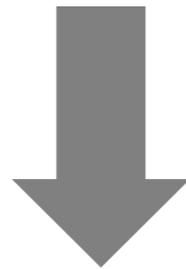
Risultati in 10-15 min

Test Line (Positive) Control Line (Valid Test)

LFLA per emocolture positive

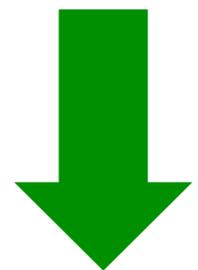


Empirica



**Revisione più accurata
(semidefinitiva)**

Terapia antibiotica

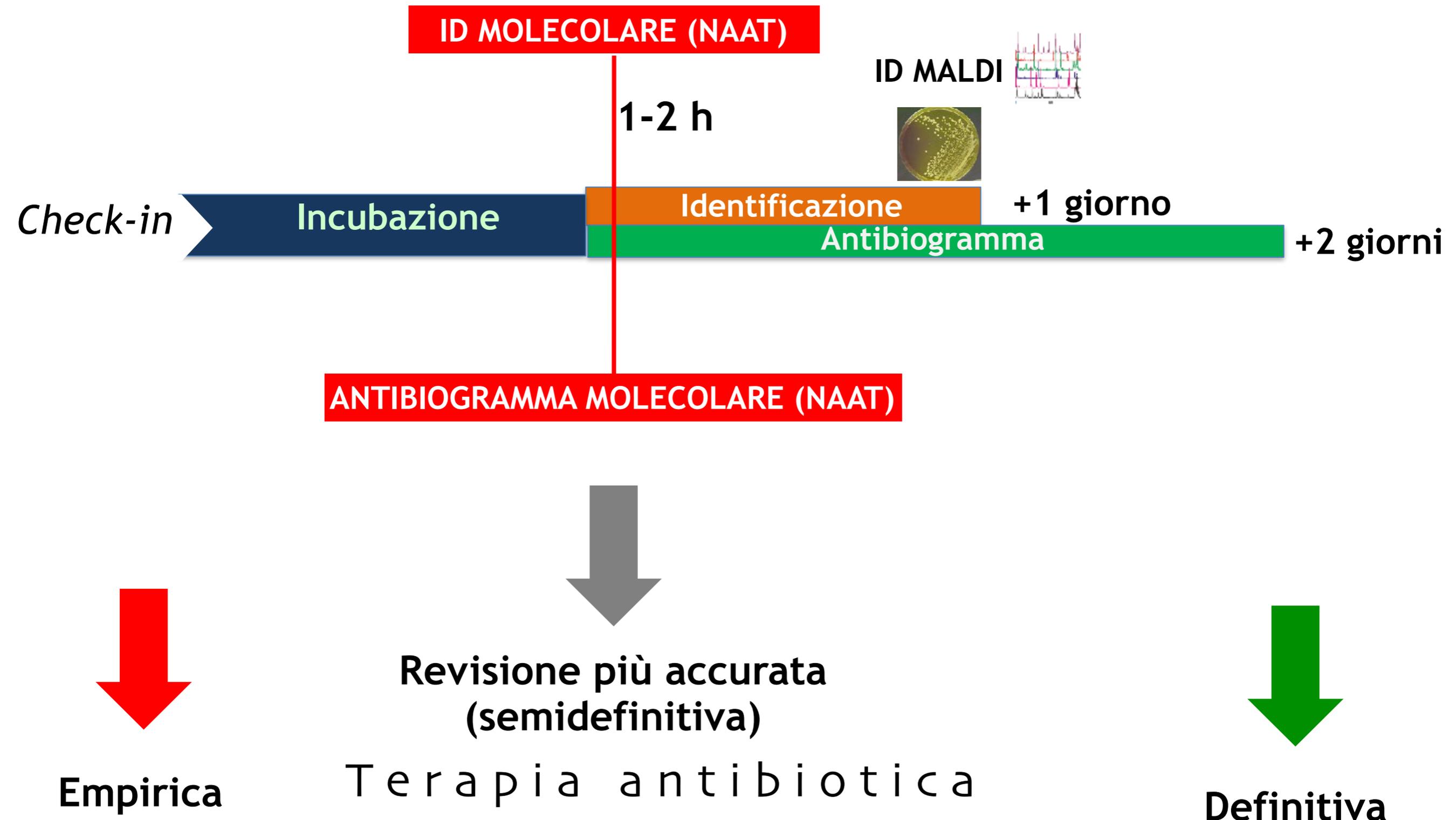


Definitiva

Coverage of carbapenemase producers by new beta-lactams

Ceftazidime Avibactam	KPC	OXA-48		
Meropenem Vaborbactam	KPC			
<i>Imipenem</i> <i>Relebactam</i>	KPC			
<i>Aztreonam</i> <i>Avibactam</i>	KPC	OXA-48	VIM	NDM
<i>Cefiderocol</i>	KPC	OXA-48	VIM	NDM

Coverage of carbapenemase producers by new beta-lactams



*NAAT per emocolture positive:
impatto su antimicrobial stewardship*

Sepsi post-chirurgia
addominale

Empirica: PIP/TAZO + VANCO



Emocoltura positiva dopo 5 ore



ID molecolare (1 h
30'):

K. pneumoniae

AB molecolare (1 h
30'):

Geni di resistenza:

CTX-M **negativo**

KPC **positivo**

VIM **negativo**

OXA-48 **negativo**

NDM **negativo**

Revisione:upgrade a regime anti-CRE

Revisione anticipata di 1-2 giorni

Klebsiella pneumoniae da emocoltura

Antibiogramma fenotipico (arriverà 2 giorni dopo)

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Amoxi/Clav	>16 R
Pip/Tazo	>128 R
Ceftriaxone	>4 R
Ceftazidime	>128 R
Cefepime	>32 R
Ertapenem	>1 R
Imipenem	>16 R
Meropenem	>64 R
Fosfomicina	>128 R
Amikacina	>16 R
Gentamicina	1 S
Ciprofloxacina	>4 R
Tigeciclina	1 S
Colistina	>8 R
CAZ-AVI	4 S

Antibiogramma molecolare

Geni di resistenza:

CTX-M	negativo
KPC	positivo
VIM	negativo
OXA-48	negativo
NDM	negativo

- Presumo resistenza ai beta-lattamici compresi i carbapenemi
- E' una KPC: quindi molto probabilmente sensibile a CAZ-AVI
- No informazioni su sensibilità a colistina, tigeciclina, fosfomicina, gentamicina, amikacina
- Non mi dice MIC di meropenem

Antibiogramma molecolare: limiti

- **Ricerca solo alcuni meccanismi di R**



Arena et al – Fut Microbiol 2017

Pannelli per diagnostica molecolare per sepsi

Filmarray

Verigene Gram-neg

Category	Target
Gram-negative bacteria	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i>
Fungi	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i>
Antibiotic resistance markers	<i>mecA</i> <i>vanA/vanB</i> KPC

Escherichia coli,
Enterobacter spp.
Klebsiella oxytoca,
Klebsiella pneumoniae
Serratia marcescens
Proteus spp.
Citrobacter spp.
Acinetobacter spp.
Pseudomonas aeruginosa

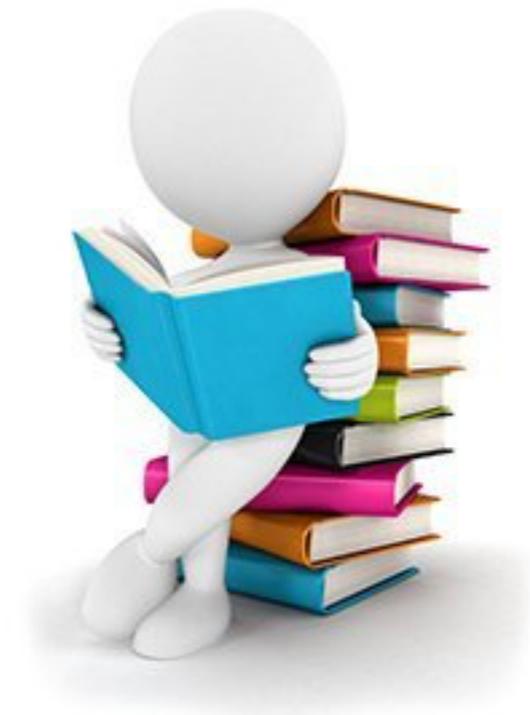
CTX-M (ESBL)
KPC
OXA
VIM
NDM

Antibiogramma molecolare: limiti

- **Ricerca solo alcuni meccanismi di R**
- **Informa prevalentemente su resistenze**
- **Non restituisce le MIC**
- **Informazioni di tipo diverso**

Antibiogramma molecolare: limiti

- **Ricerca solo alcuni meccanismi di R**
- **Informa prevalentemente su resistenze**
- **Non restituisce le MIC**
- **Informazioni di tipo diverso**
- **Possibili risultati ambigui**



Sepsi post-cardiochirurgica

Empirica: Meropenem + VANCO



Emocoltura positiva dopo 12 ore

ID molecolare (1 h):

- *Staphylococcus spp.*
- *S. aureus*

AB molecolare (1 h):

Geni di resistenza:

mecA **positivo**
vanA/B negativo



REVISIONE?

Due giorni dopo il quadro completo:

- Tutte le EMO positive per MSSA
- Primo flacone positivo anche per MR-CoNS (contaminante)

Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America

Tamar F. Barlam,¹ Sara E. Cosgrove,² Lilian M. Abbo,³ Conan MacDougall,⁴ Audrey N. Schuetz,⁵ Edward J. Septimus,⁶ Arjun Srinivasan,⁷ Timothy H. Dellit,⁸ Yngve T. Falck-Ytter,⁹ Neil O. Fishman,¹⁰ Cindy W. Hamilton,¹¹ Timothy C. Jenkins,¹² Pamela A. Lipsett,¹³ Preeti N. Malani,¹⁴ Larissa S. May,¹⁵ Gregory J. Moran,¹⁶ Melinda M. Neuhauser,¹⁷ Jason G. Newland,¹⁸ Christopher A. Ohi,¹⁹ Matthew H. Samore,²⁰ Susan K. Seo,²¹ and Kavita K. Trivedi²²

XVII. Should ASPs Advocate for Rapid Diagnostic Testing on Blood Specimens to Optimize Antibiotic Therapy and Improve Clinical Outcomes?

Recommendation

18. We suggest rapid diagnostic testing in addition to conventional culture and routine reporting on blood specimens if combined with active ASP support and interpretation (*weak recommendation, moderate-quality evidence*).

Comment: Availability of rapid diagnostic tests is expected to increase; thus, ASPs must develop processes and interventions to assist clinicians in interpreting and responding appropriately to results.

Conclusioni

- Antibiogramma: elemento essenziale nei programmi di *antimicrobial stewardship*
- Antibiogramma: analisi complessa che richiede competenze specialistiche (microbiologo clinico con esperienza nel settore)
- Antibiogramma: scelta antibiotici e criteri di refertazione da condividere con tutti i componenti il *team* di AS
- Nuove tecnologie per antibiogrammi più rapidi: necessità di conoscerle ed implementarle nei percorsi diagnostici secondo un criterio di *stewardship diagnostica*



**Azienda
Ospedaliero
Universitaria
Careggi**

bruno.viaggi@gmail.com
gianmaria.rossolini@unifi.it