

## Strumenti diagnostici e test di sensibilità agli antibiotici nell'approccio alla terapia della mastite bovina

N. Arrigoni\*, C. Garbarino\*, A. Franco\*\*, A. Battisti\*\*

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Piacenza

\*\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Sede di Roma, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza

### Introduzione

I quantitativi di antibiotici impiegati nell'allevamento bovino da latte in Italia non sembrano essere il principale fattore di rischio per i livelli di resistenza agli antibiotici osservati nelle filiere zootecniche. Nel 2012, il Dipartimento di Veterinaria del Ministero della Salute, ha ritenuto prioritaria la stesura di linee guida (1) per l'uso razionale degli antibiotici nell'allevamento suino, avicolo e cunicolo, nei quali le terapie di massa sono maggiormente utilizzate. Tuttavia non vi è dubbio che, dopo l'estensivo utilizzo degli antibiotici nei bovini da carne (specialmente nei vitelli a carne bianca), la terapia e la c. d. "profilassi" della mastite siano le cause del maggiore utilizzo di antibiotici nell'allevamento bovino (2).

Purtroppo, ancora oggi, molto spesso la terapia antibiotica viene effettuata senza il supporto di un'adeguata diagnosi eziologica (isolamento ed identificazione dell'agente causale), di test di sensibilità agli antibiotici, né di una accurata registrazione dei segni clinici e degli esiti della terapia. L'utilizzo indiscriminato e non razionale della terapia antibiotica, oltre a non essere sempre supportato da dati di efficacia in termini di costo-beneficio, ha creato indubbi problemi sia all'industria di trasformazione che al consumatore, con il rischio di presenza di residui nel latte e nelle carni e quello di sviluppo e diffusione dell'antibiotico-resistenza negli agenti patogeni animali e zoonosici, che ha indotto le autorità competenti internazionali, europee ed italiane ad emettere raccomandazioni sui principi dell'uso responsabile degli antibiotici nel sistema zootecnico.

Lo scopo di questa relazione vuole essere quello di sensibilizzare i veterinari a servirsi del supporto della diagnostica di laboratorio a vantaggio della gestione complessiva del problema "mastite", fornendo loro gli elementi per orientare l'utilizzo degli strumenti diagnostici clinici e di laboratorio. Una gestione efficace ed efficiente della mastite è basata su tre livelli di conoscenza:

1. il livello di gravità della mastite, definito attraverso l'**esame clinico**;
2. la conoscenza dell'agente eziologico, dimostrato attraverso **esami culturali** specifici (isolamento ed identificazione dell'agente responsabile);
3. la conoscenza della sensibilità agli antibiotici, valutato attraverso il c. d. **antibiogramma** sugli agenti isolati.

### **1** Esame clinico

La prima fase della corretta gestione delle mastiti cliniche è graduare la gravità del processo.

La classificazione clinica più semplice e più utilizzata prevede 3 livelli di gravità (3):

- 1: *lieve*, caratterizzata unicamente da alterazioni del latte, mentre non si rilevano né sintomi a livello mammario, né generali. Rappresenta il 60-90% dei casi di mastite clinica (4);
- 2: *moderata*, dove, oltre alle alterazioni del latte, sono presenti anche segni di infiammazioni della mammella. Rappresenta il 10-30% dei casi di mastite clinica (4). Secondo altri autori possono essere classificati come mastiti moderate anche casi in cui non compaia più di uno dei sintomi generali citati al livello 3;
- 3: *grave*, dove ai sintomi precedenti si associano sintomi generali (febbre, anoressia, blocco ruminale, calo significativo della produzione). Secondo alcuni autori devono essere presenti almeno 2 sintomi generali. Generalmente rappresenta il 5-20% delle mastiti cliniche (3).

Roberson (4) suggerisce, per una maggiore obiettività e una più precisa classificazione, di adottare altri parametri descrittivi aggiuntivi, quali la temperatura rettale, lo stato di idratazione, l'attività ruminale, l'aspetto del secreto.

Altre classificazioni, alcune basate più sui segni locali, altre su quelli generali, sono state proposte da altri autori, con la limitazione che il sistema di classificazione, se troppo complesso, potrebbe non essere adottato in modo uniforme in diversi contesti di allevamento, al fine dell'adozione di decisioni gestionali o terapeutiche.

### **A cosa serve classificare la gravità dei sintomi?**

Per prima cosa, mettere in atto sistematicamente questo procedimento serve a prendere delle decisioni in merito alle azioni da adottare. Infatti, per i casi lievi o moderati è consigliabile attendere l'esito dell'esame colturale prima di intervenire, anche se i casi moderati vanno monitorati con attenzione perché possono aggravarsi. Al contrario, nei casi gravi è consigliato un intervento immediato.

Secondariamente, a predire con una certa probabilità l'agente coinvolto. E' bene sottolineare che le caratteristiche cliniche della mastite, anche se possono indirizzare la diagnosi verso un agente eziologico piuttosto che un altro, non sono in assoluto indicative dell'eziologia. E' infatti opinione comune che, parlando di mastite ambientale, i casi gravi di mastite siano causati da coliformi e quelli moderati/lievi da streptococchi "ambientali". In realtà diversi studi hanno dimostrato che circa il 50% dei casi di mastite grave è causata da coliformi, e che anche gli streptococchi ambientali ed altri agenti (*Arcanobacterium pyogenes*, lieviti, ecc) possono causare sintomatologia sovrapponibile (4).

D'altra parte, i coliformi, frequentemente responsabili di forme cliniche acute, possono anche generare forme cliniche lievi, talvolta con tendenza alla cronicizzazione. E' quindi evidente che non è possibile attribuire con assoluta certezza ad un agente eziologico una determinata forma clinica. Dato però che un esame colturale richiede almeno 24 - 48 ore, che salgono ad almeno 48-72 ore (a seconda dell'agente eziologico coinvolto) nel caso sia eseguito un test di sensibilità agli antibiotici (antibiogramma), in caso di terapia d'urgenza la classificazione clinica può servire, specialmente se supportata da dati "storici" (precedenti indagini di laboratorio eseguite in allevamento), ad orientare la diagnosi presuntiva. Sulla base di questa può venire adottato un protocollo terapeutico predefinito dal veterinario aziendale.

E' comunque consigliabile prelevare campioni per l'esame colturale prima di trattare l'animale; l'esito sarà comunque utile per:

- a) apportare le opportune correzioni terapeutiche, nel caso di insuccesso della terapia con l'antibiotico utilizzato empiricamente;
- b) detenere ed aggiornare un insieme rappresentativo di informazioni circa la casistica di agenti di mastite in allevamento e relativo spettro di sensibilità (dati storici di allevamento).

Qualunque sia la classificazione adottata, questa deve essere il più possibile obiettiva, rapida, facile da realizzare, e ripetibile tra i diversi addetti, che devono essere chiaramente informati e formati su questo aspetto.

I dati relativi alla classificazione clinica devono entrare a far parte delle registrazioni di routine dell'allevatore, in un documento *ad hoc* che preveda anche la registrazione delle terapie adottate (specialità medicinale, dosaggio e giorni di terapia), dell'esito dell'esame colturale e dell'evoluzione clinica (guarigione, eventuale recidiva o riforma).

Per formulare una diagnosi presuntiva possono essere utili anche i dati dell'anamnesi generale di allevamento, da integrare con analisi di laboratorio mirate.

Di seguito viene riportata una tabella in cui vengono elencati i principali agenti eziologici di mastite e le caratteristiche con cui si presentano più frequentemente.

Agente eziologico	Nel gruppo o nel latte di massa	Nell'animale
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Aumento significativo e persistente SCC Aumento CBT in caso di prevalenza elevata	Aumento significativo e persistente SCC Significativo calo produttivo Scarsa correlazione con stadio di lattazione Raramente mastite clinica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aumento moderato SCC	Aumento moderato SCC Generalmente forma subclinica Talvolta mastite lieve Raramente mastite gangrenosa Moderato calo produttivo
<i>Mycoplasma bovis</i>	Presenza forme articolari in animali di ogni età Presenza otiti e forme respiratorie nei vitelli Recente introduzione di animali	Mastite parenchimatosa Calo significativo della produzione latte Aumento volume linfonodi sopraammari Interessamento di più quarti Assenza di risposta ai comuni antibiotici Latte "alterato" (sedimento, colorazione scura)
<i>Prototheca spp.</i>	Aumento SCC in caso di prevalenza elevata Aumento CBT in caso di prevalenza elevata	Aumento SCC graduale e persistente Mastite cronica evolutiva, subclinica o lieve Indurimento e atrofia del quarto Totale refrattarietà a tutti i trattamenti antibiotici
Streptococchi "ambientali"	Aumento SCC in caso di prevalenza elevata Aumento CBT in caso di prevalenza elevata	Forme cliniche moderate o lievi (talvolta gravi) Frequentemente inizio lattazione Esito culturale positivo Possibile tendenza alla cronicizzazione
Coliformi ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , etc.)	Aumento del latte di scarto	Forme cliniche gravi o moderate (talvolta lievi) Frequentemente inizio lattazione Frequentemente esito culturale negativo Generalmente breve durata
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Forme generalmente sporadiche	Latte alterato e maleodorante Presenza di ascessi nel parenchima

Tabella 1: Principali agenti di mastite e loro sintomi caratteristici ([www.nmconline.org](http://www.nmconline.org))  
(SCC: conta cellule somatiche; CBT: carica batterica totale)

## **2. Esame colturale**

Anche nell'allevamento gestito al meglio, in cui la mastite non costituisce un problema, si deve sempre seguire un protocollo diagnostico che preveda il monitoraggio su tutti i casi di mastite clinica. Questa procedura è sempre consigliabile, in tutti gli allevamenti, per mantenere una sorveglianza efficace a cogliere eventuali problemi sul nascere, prima che diventino troppo estesi e quindi più difficili da risolvere.

Il monitoraggio delle mastiti cliniche deve pertanto far parte di una routine di test diagnostici, a fianco di altre analisi da adottare routinariamente (su animali introdotti, alla messa in asciutta o nel post-partum, su vacche con elevato contenuto in cellule somatiche).

I dati della bibliografia, confermati dai dati dell'attività diagnostica IZSLER, dicono che, in una percentuale elevata di campioni provenienti da bovine con forma clinica (25-40%, dati NMC) può accadere che l'esame colturale risulti negativo.

Questi risultati (5) possono essere dovuti a diverse motivazioni:

- alcuni agenti (*Mycoplasma*, *S. aureus*, coliformi) vengono spesso escreti in basse quantità, inferiori ai limiti di rilevazione delle metodiche comunemente in uso, che prevedono la coltura in piastra di 0,01 ml per campione (soglia di rilevabilità: 100 UFC/ml latte);
- il microrganismo può non essere più presente in mammella ed i segni clinici visibili sono dovuti alla presenza di tossine (es. coliformi);
- le cellule somatiche possono aver fagocitato il microrganismo (es. *S.aureus*);
- gli antibiotici hanno ucciso o soppresso la vitalità/coltivabilità del microrganismo;
- il campione è stato prelevato e/o conservato in maniera non idonea, per cui la flora contaminante ha inficiato la lettura;
- il microrganismo richiede particolari condizioni di crescita (T, tempo di incubazione prolungato, terreni particolari, condizioni di microaerofilia o anaerobiosi).

Per ovviare a questi problemi ed ottenere un risultato il più affidabile possibile, è indispensabile prelevare il campione in asepsi accurata, refrigerarlo e consegnarlo al laboratorio al più presto e

comunque entro 24 ore. Se questo non è possibile, meglio congelare il campione tenendo presente che, per alcuni agenti eziologici particolarmente labili, in particolare quando presenti nel latte in basse concentrazioni (es. *Mycoplasma*, coliformi), questo può comportarne un'ulteriore diminuzione, con conseguente possibilità di false negatività.

Per certi agenti è necessario utilizzare terreni specifici e incubazione in atmosfera arricchita in CO<sub>2</sub> (*Mycoplasma*) o altre miscele di gas (*Campylobacter*) oppure è necessario aumentare il volume di latte inoculato (per i coliformi è consigliato inoculare 0,1 ml invece di 0,01 ml su specifico terreno selettivo) o ancora prolungare l'incubazione oltre alle classiche 48 ore (*Prototheca spp.*, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Mycobacterium spp.*, *Candida spp.*).

### **A cosa serve l'esame colturale?**

Lo scopo primario dell'esame batteriologico è quello di avere a disposizione delle informazioni sugli agenti prevalenti di mastite specifici dell'allevamento e sulla loro sensibilità agli antibiotici, da valutare mediante antibiogramma.

Le informazioni derivanti dall'esame colturale sono inoltre necessarie per poter adottare opportuni piani di profilassi, modulati in base all'epidemiologia degli agenti stessi, siano essi contagiosi (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*) o ambientali (Streptococchi "non agalactiae", coliformi, *Pseudomonas spp.*, *Prototheca spp.*).

Bisogna tenere presente che negli ultimi anni questa rigida distinzione è divenuta sempre più sfumata, in quanto alcuni agenti ambientali (*S. uberis*, *Klebsiella spp.*, *Prototheca spp.*) hanno dimostrato la possibilità di divenire contagiosi, trasmettendosi da bovina a bovina durante le fasi di mungitura. Teoricamente, tutti i microrganismi in grado di adattarsi alla mammella causando infezioni subcliniche, che vengano escreti con il latte in numero sufficiente, possono diventare contagiosi (3).

Ai fini dell'uso corretto e responsabile del farmaco, è da ricordare che, oltre ad alghe (*Prototheca spp.*) e lieviti (es. *Candida spp.*), la terapia antibiotica, in caso di isolamento di alcuni specifici agenti patogeni, risulta essere di scarsa efficacia (Es. *Mycoplasma spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas spp.* e *Pasteurella spp.*) e pertanto una precisa diagnosi eziologica è alla base delle valutazioni decisionali circa l'animale da trattare.

L'aver a disposizione i ceppi isolati in coltura rende possibili approfondimenti identificativi e di similarità, mediante test biomolecolari (PCR, PFGE), relativi alle loro caratteristiche genotipiche, che forniranno informazioni utili per l'assunzione di decisioni relative alla gestione del focolaio. Per esempio, in un allevamento dove sono frequenti gli isolamenti di *S. uberis* è possibile sottoporre i ceppi isolati a test biomolecolari (PFGE), verificando se i ceppi sono differenti, e quindi è da presupporre una origine ambientale, o hanno elevata similarità fra loro, facendo invece presupporre una origine contagiosa del patogeno.

Un altro esempio applicativo è l'approfondimento diagnostico su ceppi di *Prototheca spp.* isolati da un allevamento bovino; mediante indagini biomolecolari è possibile distinguere ceppi ambientali (*Prototheca zopfii gen. 1*) da ceppi patogeni per la mammella (*Prototheca zopfii gen. 2*, *Prototheca blaschkeae*) e anche distinguere, tra quelli patogeni per la mammella, quelli con tendenza alla diffusione (*Prototheca zopfii gen. 2*) da quelli generalmente poco contagiosi (*Prototheca blaschkeae*)(6).

### **3. Antibiogramma**

L'antibiogramma consiste nella valutazione *in vitro* dell'attività delle diverse classi di molecole antibiotiche nei confronti di uno specifico agente batterico ed ha funzione di "servizio diagnostico" utile ad orientare la terapia.

Nel caso di agenti di mastite *contagiosa*, in cui si presume una circolazione di uno stesso ceppo nell'allevamento, i risultati dell'antibiogramma sono generalmente utilizzabili sul gruppo, estendendo la sua applicazione a tutti gli animali infetti. In questo caso il monitoraggio mediante

antibiogramma ha anche la funzione di verificare nel tempo lo sviluppo di eventuali resistenze nei confronti di determinate categorie di antibiotici (valutazione del trend in azienda).

Nel caso di agenti batterici di origine *ambientale*, i risultati dell'antibiogramma sono rappresentativi per il solo agente testato, poiché gli isolati possono avere spettri di sensibilità anche molto diversi tra loro.

Una possibile ed importante applicazione dell'antibiogramma sugli isolati di *S. aureus* riguarda la valutazione della resistenza ad oxacillina che rappresenta un marker della resistenza a tutti gli antibiotici beta-lattamici (dalle penicilline alle cefalosporine di terza e quarta generazione); la resistenza ad oxacillina, valutata applicando procedure di laboratorio rigorose e con evidenza di validità, ha un ottimo potere predittivo nei confronti della presenza dei geni *mec* ed in particolare del gene *mecA*, caratteristico dei ceppi meticillino-resistenti (MRSA). Monitorare la presenza di *S. aureus* meticillino-resistenti in allevamento, oltre che per ovvi motivi di Sanità Pubblica Veterinaria, è importante perché, oltre alla resistenza nei confronti di tutti i betalattamici, spesso nei cloni di MRSA circolanti nelle produzioni zootecniche si osserva resistenza ad altre classi di molecole, ovvero multiresistenza (7).

### **Come eseguire l'antibiogramma?**

In corso di mastite clinica, una volta che l'esame colturale abbia rilevato la presenza di un agente batterico patogeno, il laboratorio è chiamato ad eseguire il test per la sensibilità agli antibiotici secondo la metodica consigliata dagli standard di riferimento internazionali.

Tali Standard vengono continuamente e costantemente rivalutati ed aggiornati da panel di esperti internazionali. Attualmente lo standard internazionale di riferimento disponibile per i test di sensibilità in funzione della terapia in Medicina veterinaria è il Documento M31-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)(8). Affinché l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici possa fornire dei dati validi per la terapia, è necessario che la combinazione agente batterico/molecola antibiotica abbia subito un processo di standardizzazione da parte di Istituzioni Internazionali competenti. Nel caso specifico, il CLSI procede alla validazione primaria della prova di sensibilità agli antibiotici, quindi fornisce le indicazioni affinché la prova possa essere riprodotta nei diversi laboratori periferici per la produzione di risultati validi.

Ad oggi, per alcune combinazioni agente batterico/molecola antibiotica, non è disponibile o non è stato possibile ottenere una validazione primaria; di fatto si sconsiglia di effettuare e refertare test "diagnostici" *in vitro* per tali molecole (es. cloxacillina, dicloxacillina, lincomicina, streptomina, etc.), a causa della scarsa riproducibilità *in vitro* dei test di sensibilità ad esse relativi. Tuttavia, è previsto dagli Standard che la loro efficacia *in vivo* possa essere predetta mediante l'utilizzo di altre molecole della stessa classe.

La valutazione della sensibilità ai chemioantibiotici, anche in Medicina Veterinaria, è una delle prove di laboratorio di servizio diagnostico più delicate, poiché orientano la terapia antibiotica dei casi clinici (individuali e di gruppo). E' pertanto necessario che abbia presupposti ed evidenza di validità. Tutto il processo diagnostico, infatti, dovrebbe essere ambito di azione di Enti/laboratori che adottino Standard Internazionali di Qualità nella gestione delle prove (ISO 17025), ovvero tipicamente Enti/laboratori "accreditati".

Per valutare la sensibilità dei batteri agli antimicrobici vengono raccomandate dagli Standard Internazionali due categorie di metodiche, *per diluizione* (in brodo o in agar) o *per diffusione*. Indipendentemente dal metodo adottato, per ottenere risultati affidabili è indispensabile aderire ai protocolli di garanzia di qualità che diano in ogni caso evidenza di validità.

I metodi *per diluizione* prevedono l'inoculo del batterio in un terreno che contiene diluizioni seriali dell'antimicrobico in questione e la valutazione della inibizione di crescita.

Tali test, che prevedono la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC = minima concentrazione di un antibiotico che inibisce la crescita di uno specifico ceppo batterico), costituiscono il *gold standard* per la valutazione della sensibilità *in vitro* e vengono applicati

solitamente per studi di sensibilità o per scopi di monitoraggio/sorveglianza, data la loro laboriosità e il loro costo elevato.

Il metodo routinariamente applicato dal laboratorio diagnostico, per la sua rapidità di esecuzione e il suo basso costo, è il metodo *per diffusione* (disk diffusion) secondo la metodica di Kirby-Bauer. In breve, la metodica prevede l'inoculazione di una sospensione a concentrazione nota di un isolato batterico già identificato sulla superficie di una piastra di terreno agarizzato adeguato all'agente da testare, di spessore noto (es. Muller-Hinton agar, Muller-Hinton agar sangue). Successivamente vengono deposti sulla superficie della piastra dischetti a concentrazione nota di antibiotico e la piastra viene quindi incubata secondo modalità previste dallo Standard (es. per la maggior parte degli agenti a crescita rapida ed aerobia, a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 16-18 ore).

Durante questa fase l'antibiotico diffonde nell'agar in prossimità del dischetto, con concentrazione esponenzialmente decrescente. Viene quindi misurato il diametro degli aloni di inibizione che circondano il dischetto del singolo principio attivo ed il relativo valore viene confrontato con una griglia interpretativa, in base alla quale il batterio viene definito resistente/intermedio/sensibile (c. d. "breakpoint clinici") nei confronti del singolo principio attivo. Il diametro di inibizione, è correlato alla concentrazione minima inibente ed indica la sensibilità "in vitro" dell'isolato al principio attivo; solitamente il risultato ottenuto è predittore dell'efficacia/non efficacia clinica dimostrata in studi di campo.

La procedura di esecuzione della metodica, in particolare le concentrazioni di antibiotico nei dischetti e le misure interpretative in relazione alle specie batteriche, deve seguire standard internazionalmente condivisi (vedi il citato Standard CLSI), in quanto una non scrupolosa esecuzione può inficiare il risultato del test. Errori possibili possono riguardare la concentrazione dell'inoculo, lo spessore del terreno agarizzato e la conservazione dei dischetti antibiotati. Per questo è necessario effettuare un processo di validazione della prova in laboratorio, in cui si verifichi che i diametri di inibizione per ogni molecola testata nei confronti di specifici ceppi di Riferimento (es. ceppi dell'American Type Culture Collection, ATCC), ricadano entro un range definito. In particolare, è necessario effettuare inizialmente almeno 30 prove consecutive, il cui range deve rientrare in quello previsto dallo Standard (non più di 3 su 30 risultati può eccedere dal range). Allorché vi sia evidenza di "stabilità" della prova in termini di ripetibilità ed accuratezza, si può passare a controlli di qualità periodici (es. settimanali).

I metodi per diffusione sono standardizzati prevalentemente per batteri a rapida crescita e per alcuni batteri più difficoltosi da coltivare (ad esempio *Histophilus somni*). Per altri batteri (es. *Campylobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*) il test di diffusione non è standardizzato/standardizzabile, per diverse ragioni.

Uno dei problemi del laboratorio è definire quali principi attivi inserire nell'antibiogramma, dato il numero elevato di principi attivi presenti in specialità registrate per quella specie animale, linea produttiva ed apparato.

L'opzione ideale, istintivamente, sarebbe quella di inserire tutti i principi attivi registrati per la specie e la tipologia di produzione primaria da trattare, ammesso che abbiano evidenza di riproducibilità nei test *in vitro* (e quindi non tutte le combinazioni molecola/specie batterica). E' da sottolineare come solo alcune associazioni di diverse classi di molecole abbiano avuto consensi di standardizzazione in Medicina Veterinaria (cioè sulfonamidi e diaminopiridine, alcuni beta-lattamici come amoxicillina/ticarcillina + acido clavulanico, penicillina + novobiocina) ovvero diano garanzie di riproducibilità ed in definitiva di validità costante del risultato fornito nei test *in vitro*.

In pratica però la scelta, per ragioni di razionalità ed economicità, è quella di considerare che esistono molecole rappresentative per classi/subclassi di antibiotici (c. d. "class representative"), ovvero "molecole prototipo". E' quindi opportuno inserire nel pannello dell'antibiogramma almeno le molecole "prototipo" di ogni classe/subclasse. Con questo approccio, è sempre possibile coprire un vasto range di classi di molecole con un numero "ragionevole" di dischetti da utilizzarsi nelle prove. Tali criteri sono disponibili "online" e periodicamente aggiornati presso il seguente url

dell'IZSLT, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (9):  
[http://195.45.99.82:800/Molecole\\_prototipo\\_e\\_loro\\_equivalenti\\_in\\_vitro\\_2013.pdf](http://195.45.99.82:800/Molecole_prototipo_e_loro_equivalenti_in_vitro_2013.pdf)

I suddetti riferimenti costituiscono anche una pratica guida al significato dei risultati dei test *in vitro* per un approccio terapeutico più consapevole.

### **Come valutarne il risultato?**

Secondo le “linee guida”, le molecole prototipo, rappresentative per determinate classi e subclassi di chemioantibiotici, sono utilizzate per valutare la sensibilità dell'isolato anche nei confronti delle molecole rappresentate.

Nel caso in cui più molecole della stessa classe/subclasse con identico spettro di sensibilità siano inserite nella composizione del panel per l'antibiogramma, può accadere che vengano riportati risultati discordanti. La non concordanza tra tali risultati molto spesso ha alla base problemi metodologici, oppure limiti intrinseci nella valutazione della sensibilità agli antibiotici attraverso il metodo di disk diffusion, che utilizza breakpoint clinici “operativi”. Per tali motivi è preferibile includere nel panel dell'antibiogramma le sole molecole prototipo, ovvero “affidare” il valore predittivo del risultato del test “in vitro”, in funzione dell'efficacia terapeutica, alle sole molecole “prototipo”.

E' da sottolineare inoltre quanto riportato dallo Standard CLSI relativamente all'oxacillina; i ceppi di *Staphylococcus* spp. risultati resistenti alla oxacillina debbono essere considerati resistenti non solo a meticillina, nafcillina e cloxacillina, ma a tutti i betalattamici (quindi anche alle cefalosporine di terza e quarta generazione).

Oltre alle indicazioni dell'antibiogramma, la scelta del farmaco deve considerare anche i parametri di farmacocinetica, quali la biodisponibilità, la distribuzione nei tessuti, l'emivita, la cinetica per assicurare che l'agente scelto raggiunga il sito di infezione. Ad esempio, tra le molecole utilizzate per via sistemica, le tetracicline, benché siano ad ampio spettro, hanno una bassa biodisponibilità, dovuta al loro legame irreversibile con le componenti del latte, e per questo sono di limitata efficacia per il controllo delle mastiti bovine (10).

E' da ricordare che l'uso prudente del farmaco indica di utilizzare preferenzialmente la molecola a spettro più limitato e l'uso locale endomammario piuttosto che generale; infatti antibiotici con un ampio spettro di attività portano allo sviluppo di resistenze in microorganismi non-target più rapidamente rispetto agli antibiotici con spettro d'azione più limitato. Inoltre è fondamentale rispettare le informazioni dei foglietti illustrativi, in particolare dosi e durata del trattamento e limitazioni d'uso (apparato target).

Altra raccomandazione è quella di utilizzare soltanto come *ultima ratio* alcune delle molecole considerate “di importanza critica” in terapia umana (11), quali le cefalosporine di terza e quarta generazione ed i fluorochinoloni negli animali zootecnici.

Tali classi dovrebbero essere riservate al trattamento di forme cliniche che hanno risposto scarsamente (o se esistono indicazioni sul fatto che rispondano scarsamente) ad altre classi di antibiotici (12). Appare pertanto ingiustificato il loro utilizzo estensivo per il trattamento di forme cliniche ben note nell'allevamento bovino da latte (es. pododermatite interdigitale) sostenute da agenti normalmente sensibili alle penicilline o ad altre molecole di prima generazione, purtroppo attualmente molto in voga per questioni che poco hanno a che fare con l'appropriatezza terapeutica dei casi clinici, ma piuttosto con l'utilizzo del latte prodotto. Anche l'utilizzo dei fluorochinoloni dovrebbe venire limitato nei bovini, non soltanto per salvaguardare l'efficacia terapeutica di queste molecole in terapia veterinaria, ma soprattutto per il ruolo che svolgono come antibiotici di importanza critica in medicina umana per la cura di infezioni severe ed invasive. In ogni caso, l'utilizzo di antibiotici di queste classi dovrebbe essere sempre supportato da riscontro di sensibilità nei test *in vitro* (13).

Tra le buone pratiche da seguire ricordiamo inoltre quella di evitare l'utilizzo di cocktail di antibiotici ed evitare il trattamento dei casi cronici con scarsa probabilità di successo.

L'utilizzo extra-label del farmaco è inoltre giustificabile solo e soltanto in presenza di un antibiogramma che dimostri la resistenza dell'agente eziologico alle varie molecole per le quali è disponibile una specialità medicinale registrata per la specie e l'apparato oggetto di terapia.

#### **4. Conclusioni**

La ricerca e l'identificazione dell'agente eziologico alla base del processo infettivo devono essere parte di un monitoraggio continuo dello stato di salute degli animali allevati. Tra gli strumenti da utilizzare vi sono gli esami di laboratorio mirati, definiti sulla base della situazione epidemiologica dell'azienda, della presenza di sintomi suggestivi o almeno indicativi dei vari agenti eziologici e dell'interpretazione accurata dei dati di laboratorio (es. cellule somatiche) già a disposizione dell'allevatore. Gli esami di laboratorio si rendono indispensabili non solo per raccogliere elementi utili ad impostare la terapia, ma anche per orientare il management (per esempio: verso un problema di agenti mastidogeni "contagiosi" o "ambientali"), attraverso l'identificazione e la correzione dei punti critici.

Nonostante l'utilizzo dell'antibiogramma per la terapia della mastite sia universalmente raccomandato, purtroppo i tempi tecnici necessari per la sua realizzazione sono spesso incompatibili con la tempestività dell'intervento; per questo appare importante il lavoro costante di raccolta dati, in particolare relativi alla classificazione clinica dei casi e agli esiti dei relativi isolamenti e dello spettro di sensibilità degli agenti di mastite circolanti in allevamento. L'obiettivo è quello di predire, con una buona probabilità, il protocollo terapeutico più idoneo tra quelli a disposizione del veterinario aziendale.

In caso di insuccesso o parziale efficacia della terapia, già nelle fasi iniziali, l'antibiogramma fornirà a posteriori (ma comunque al massimo entro 72-96 h) gli elementi validi per la sua correzione.

In conclusione, bisogna sottolineare come, alla base dell'uso corretto e responsabile del farmaco, vi sia un lavoro di monitoraggio continuo e di accurata registrazione di dati, processo che deve vedere riconosciuto il ruolo sempre più cruciale del veterinario di fiducia nel management aziendale; contemporaneamente va sottolineata l'importanza della formazione del personale, da realizzare attraverso un processo motivazionale che passi necessariamente dalla condivisione e dall'analisi critica delle informazioni.

Per il veterinario di campo che si avvicina al problema della gestione della mastite e della relativa terapia, il conoscere e saper interpretare il significato e la rilevanza degli strumenti diagnostici rappresenta un valore aggiunto, così come il saper orientare la diagnosi in base agli elementi anamnestici in suo possesso. Operare secondo questi criteri garantisce le più alte probabilità di successo e l'efficacia complessiva dell'azione nei confronti dei processi morbosi infettivi, evita l'utilizzo indiscriminato e spesso inutile di antibiotici, e genera nel contempo evidenza documentale di azione secondo principi di razionalità e "prudenza", a disposizione per tutte le valutazioni (es. audit) dell'Autorità di Sanità Pubblica Veterinaria.

#### **Bibliografia**

- 1 Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare e degli organi collegiali per la tutela della salute: Manuale "Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia" accessibile a:  
[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1683\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.pdf)
- 2 Constable P.D., Pyörälä S., Smith G.W. (2008) Guidelines for antimicrobial use in cattle. In: Guide to antimicrobial use in animals, Eds. Guardabassi L., Jensen L.B., Kruse H., 143-160, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- 3 Ruegg P (2012): New perspectives in udder health management. Vet Clin Food anim, 28 149-163

- 4 Roberson JR (2012): Treatment of clinical mastitis. *Vet Clin Food anim* 28, 271-288
- 5 Laboratory and field handbook on bovine mastitis, National Mastitis Council, Inc. Rev. ed. 1999
- 6 Arrigoni N, Belletti GL, Cammi G, Garbarino C, Ricchi M. (2010): Mastite bovina da Prototheca. *Large animal review*, 16:39-43
- 7 EFSA, 2009. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal* (2009) 993, 1-73
- 8 Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI M31-A3, Wayne, PA, USA.
- 9 Linee Guida per l'interpretazione delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici in vitro per un utilizzo nella terapia clinica. Direzione Operativa Diagnostica Generale Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza disponibile all'url: [http://195.45.99.82:800/Molecole\\_prototipo\\_e\\_loro\\_equivalenti\\_in\\_vitro\\_2013.pdf](http://195.45.99.82:800/Molecole_prototipo_e_loro_equivalenti_in_vitro_2013.pdf)
- 10 Kuang Y., Jia H., Miyanaga K., Tanji Y. (2009) Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84: 135-142.
- 11 WHO, 2007. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use: [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/antimicrobials\\_human.pdf](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf)
- 12 European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections. (2009) Revised reflection paper on the use of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004307.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004307.pdf).
- 13 European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections. (2006) Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food producing animals - Precautions for use in the SPC regarding prudent use guidance. Report by the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/swp/41616806en.pdf>.