



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



**Individuazione di valori breakpoint per la
resistenza
antibiotica alla tetraciclina nell'ovino, con
particolare
riferimento alle mastiti.**

Stefano Lollai – IZS Sardegna, Sassari
stefano.lollai@izs-sardegna.it



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA
"G. Pegreffi"



CReLDOC

Centro di Riferenza Nazionale
per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati
degli Ovini e dei Caprini



CReNMOC
Centro di Riferenza Nazionale
Per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini

Evento

**AGGIORNAMENTI SULLE ATTIVITA' DI
RICERCA DEL C.RE.L.D.O.C. E DEL
C.RE.N.M.O.C.**



Immagine ripresa da Tacuinum Sanitatis

13 dicembre 2022
Webinar



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Titolo

Quanto verrà esposto è il risultato del progetto di
ricerca corrente IZS SA 08/2015 RC
*« Individuazione di valori breakpoint per la resistenza
antibiotica nell'ovino, con particolare riferimento
alle mastiti »*
integrato con attività successive



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



- Laboratorio di Microbiologia Speciale – IZS Sassari (Stefano A. Lollai; Resp. Scientifico)
- CReNMOC Sassari (Eugenia A. Cannas; Simone Dore)
- Laboratorio Farmaco e Analisi dei Residui - IZS Sassari (Cecilia Testa; Severyn Salis)
- IZS Sardegna sede di Cagliari - (Manuele Liciardi)
- Central Veterinary Institute (CVI), Wageningen (NL) - (D. J. 'Dik' Mevius)
- Department of Comparative Biomedical Sciences - Royal Veterinary College, London (Ludovic Pelligand)
- Dipartimento di Scienze Biomediche – UniSS (Giovanni Sotgiu)
- CRAB – IZS LT (Antonio Battisti)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Razionale

Una corretta terapia antibiotica presuppone nota:

- la sensibilità / resistenza del patogeno
all'antibiotico

ma anche

⇒ la concentrazione dell'antibiotico nei fluidi
corporei dell'ospite



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Razionale

Ovvero presuppone noto:

- l'effetto dell'antibiotico sul patogeno (PD)
- la farmacocinetica (PK) dell'antibiotico nell'ospite



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Razionale

L'azione sul microrganismo dipende infatti anche dalla PK dell'antibiotico nell'ospite animale:

perciò \Rightarrow i criteri per definire *in vitro* la resistenza del microrganismo (*cutoff*, *breakpoint*) sono specie (*animale*)-specifici



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Organizzazioni che forniscono i limiti interpretativi per i test di sensibilità in vitro (cutoff, breakpoint)

- Eucast (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EU)
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA)

richiamano infatti sulla necessità di stabilire valori specie (animale)-specifici e di rivedere anche i profili di attività dei 'vecchi' antibiotici



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Razionale

Storicamente, la MIC (minima concentrazione inibente) del batterio è stata l'indice utilizzato ai fini della terapia; tuttavia la MIC, non integrata col 'sistema' PK/PD dell'ospite (\approx specie animale) non fornisce indicazioni conclusive

Nielsen EI et al., AAC, 55:10, 2011



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



CLSI e EUCAST



Razionale

The subcommittee's goal is to establish veterinary-specific breakpoints to decrease reliance on human medical breakpoints. However, human medical breakpoints are still listed in VET08¹ Table 2 series, identified with gray-shaded text, allowing comparison of veterinary-specific and human medical breakpoints. Human medical breakpoints are occasionally necessary to provide zones of inhibition for some categories and a breakpoint for laboratories to consider when there are no veterinary breakpoints available for some antimicrobial agents and organisms for that animal species.



CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

5th Edition

VET01

Performance Standards for Antimicrobial Disk
and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria
Isolated From Animals



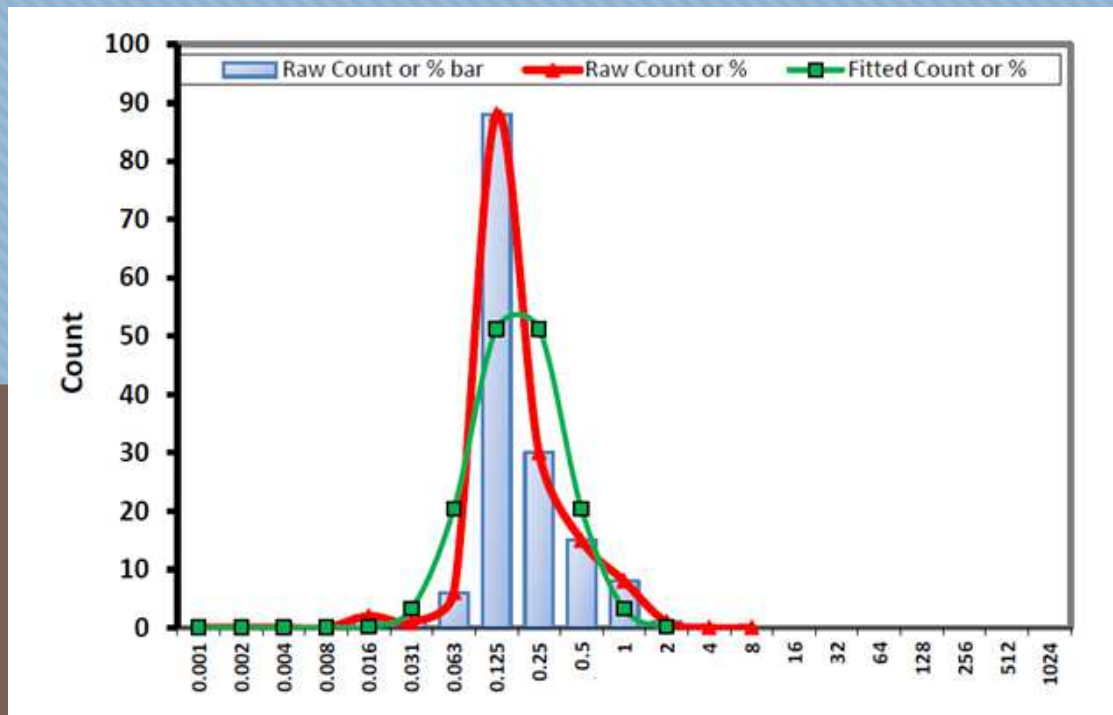
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Lo Scopo dello Studio

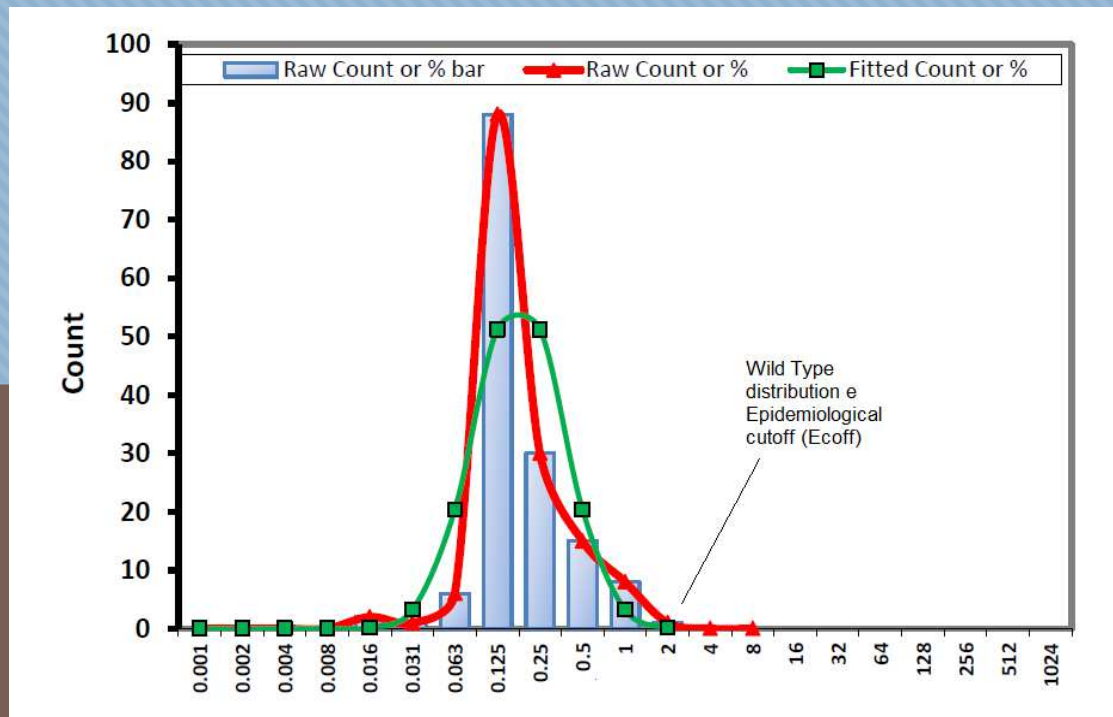


1) Determinare la distribuzione delle MIC di un patogeno mastitico (*S. uberis*) verso un antibiotico impiegato per la terapia (ossitraciclina, OTC)





1) ... individuare la distribuzione *Wild Type* dei ceppi naturali privi di resistenza (R) e il valore di MIC che li separa ('cutoff epidemiologico' o *Ecoff*)



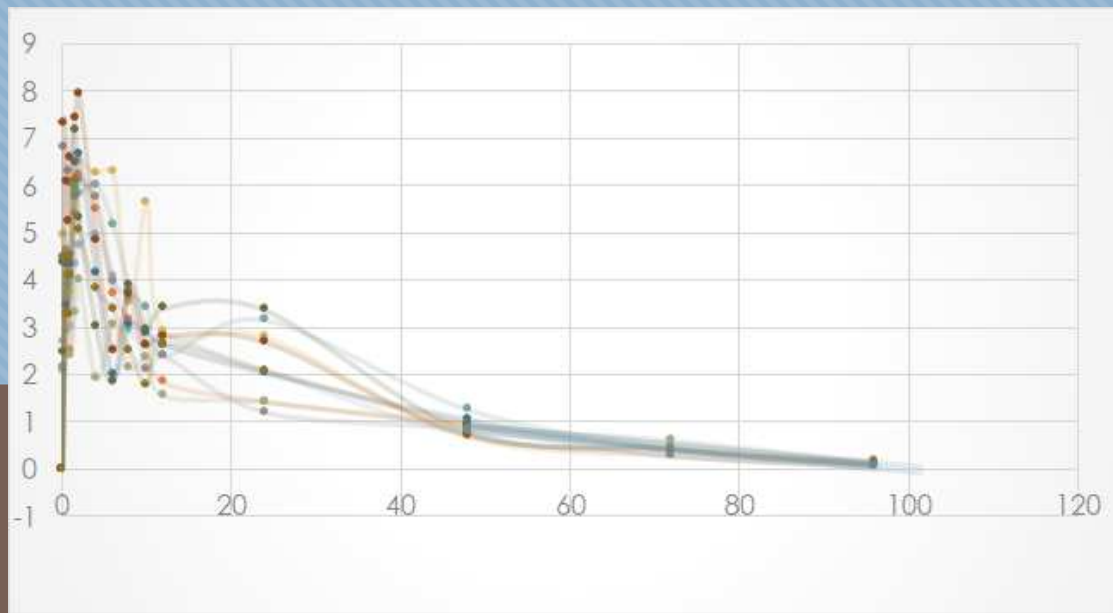


ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



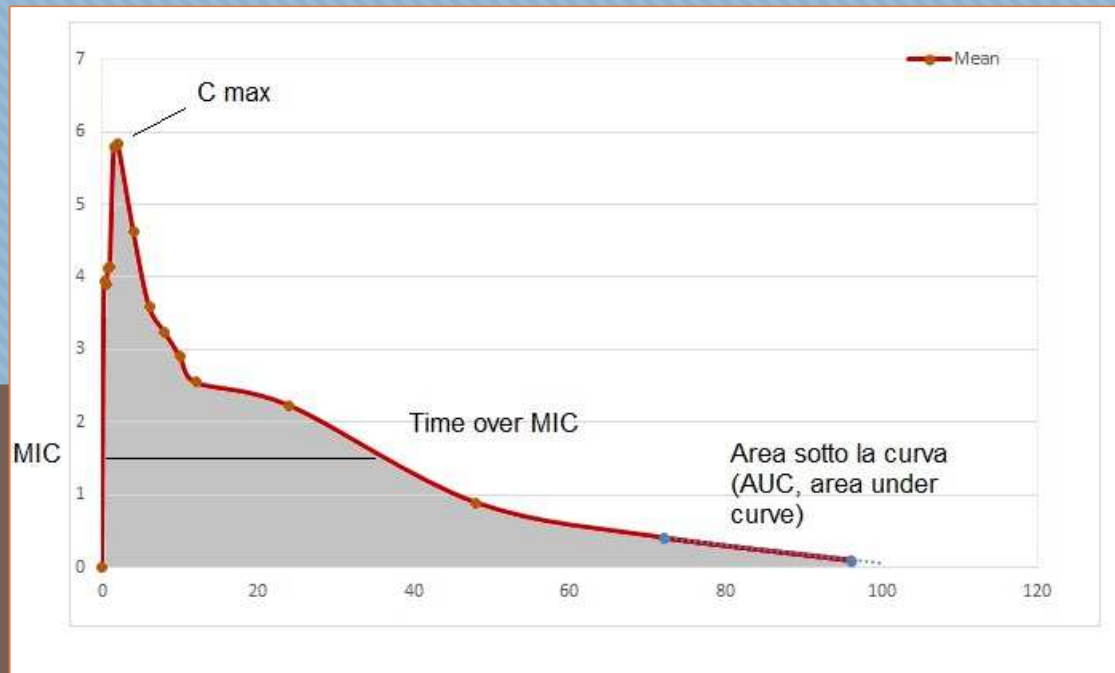
Scopo

2) studiare il profilo di concentrazione ematica nel tempo della OTC negli ovini



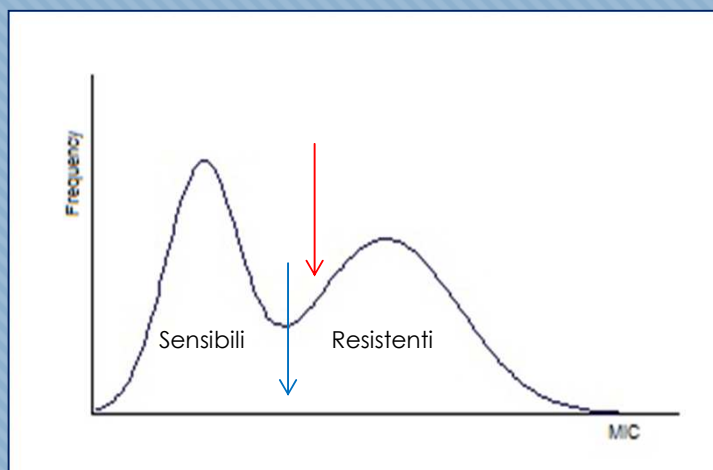


3) ricavare i parametri PK / PD (es. C_{max}/MIC , $T > MIC$, AUC/MIC)





⇒ 4) stimare i limiti di R per i test di sensibilità *in vitro* per l'ovino



Distribuzione delle MIC (S e R) del del patogeno

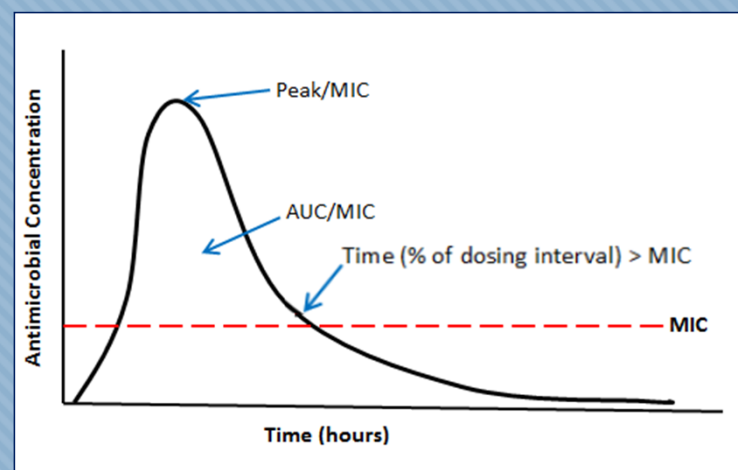


Grafico concentrazione/tempo e indici predittivi di efficacia della terapia (es. C_{max}/MIC , AUC/MIC , Time over MIC)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



M & M

- *Microrganismo e antibiotico scelti*
- *Streptococcus uberis*: batterio causa frequente di mastite clinica negli ovini, trattata in genere per via sistemica (*)
- Ossietraciclina (OTC): antibiotico impiegato nelle mastiti; si distribuisce rapidamente nei distretti corporei

(*) Bergonier D et al, Vet Res, 2003, 34(5):689-716; Sérieys et al., J Dairy Sci, 2005, 88(1):93-9; Cannas et al, Le mastiti nei piccoli ruminanti, IZS Sardegna, 2019



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



M & M; Fasi

Si è quindi proceduto a:

- 1. valutare l'azione (PD) della (ossi)tetraciclina (OTC) in S. uberis --> MIC, azione nel tempo (curve time kill)*
- 2. studio PK della OTC nella specie ovina*
- 3. integrazione dei dati --> e stima di indici per definire la R del batterio ('cutoff' o 'breakpoint') nella specie*



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

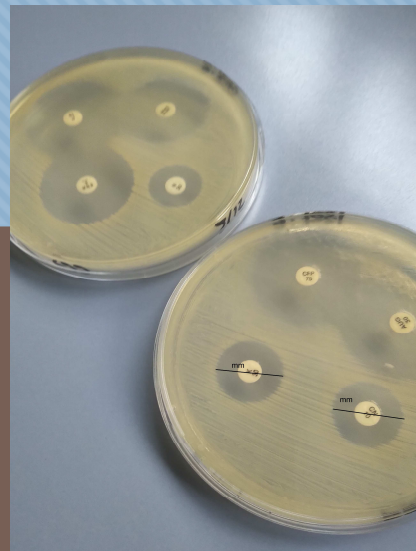


M & M

Per limiti di R (*cutoff* o *breakpoint*) intendo:

- i valori di MIC e
- i diametri dell'alone dell'antibiogramma al di sopra (sotto) dei quali il batterio è da considerarsi resistente

legati alla specie
animale in esame



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						MIC						
B												
C						MIC						
D				MIC								
E				MIC								
F						MIC						
G												
H					MIC							



Questo perché l'effetto degli antibiotici è legato a:

1. concentrazione raggiunta
→ indice fC_{max}/MIC
2. frazione di tempo in cui la C del farmaco $> MIC$
→ indice $fT > MIC$ (es. beta-lattamici)
3. rapporto tra l'area della curva C-tempo e la MIC
→ indice $fAUC/MIC$

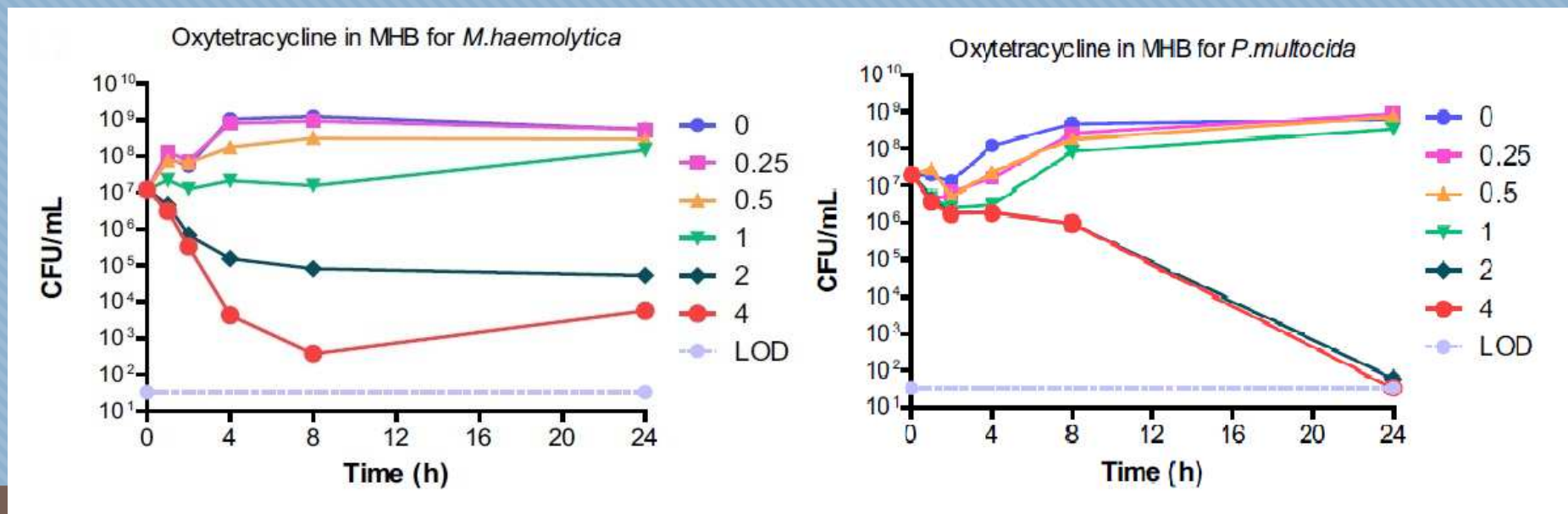


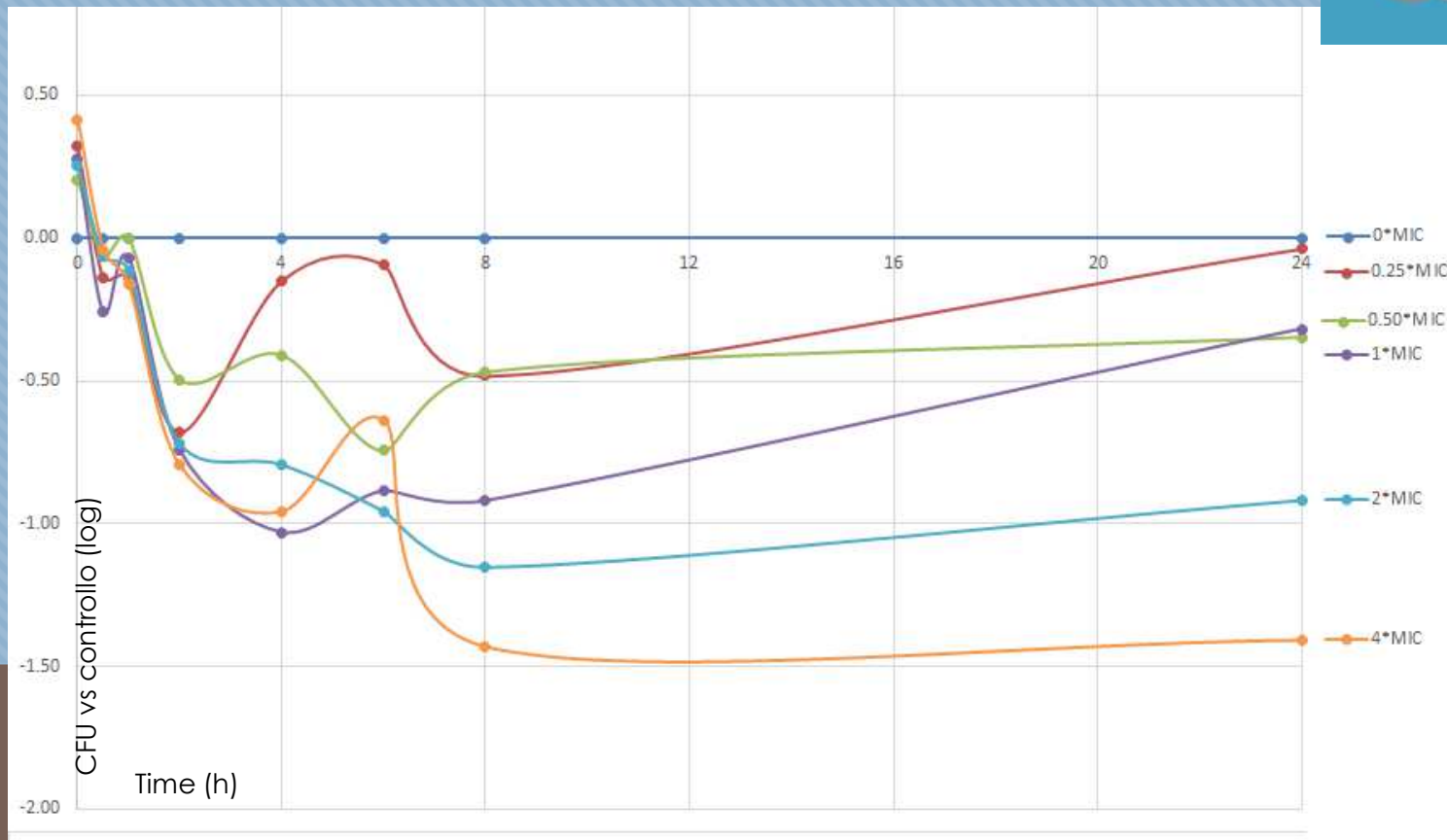
1. Picco di concentrazione:
aminoglicosidi, fluorochinoloni $\Rightarrow fC_{max}/MIC$
2. Tempo di esposizione
beta-lattamici $\Rightarrow fT > MIC$
3. Area sotto la curva concentrazione-tempo
eritromicina, fenicoli, clindamicina, tetracicline
 $\Rightarrow fAUC/MIC$

Nielsen EO, Cars O, Friberg LE, AAC, 55:10, 4619–30, 2011;
Andes D, Craig WA, Int. J. Antimicrob. Agents, 2002, 19, 261–68;
Maaland MC et al, J Clin Microbiol, 2013, 51:11, 3547–54



La (ossi)tetraciclina è sempre batteriostatica?





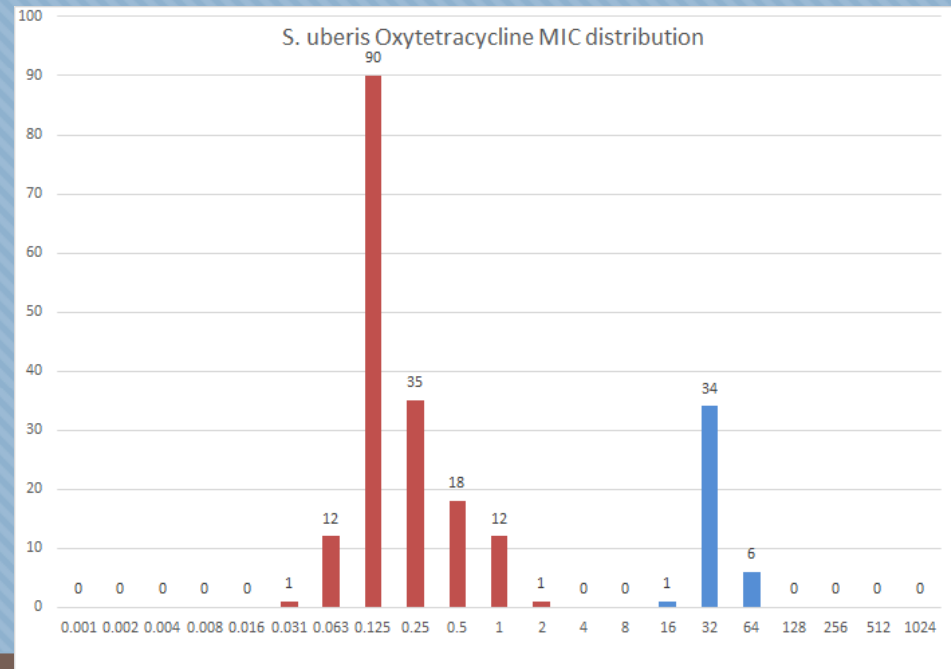
Verifica in *S. uberis* --> Time Kill curves



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



1. Distribuzione delle MIC



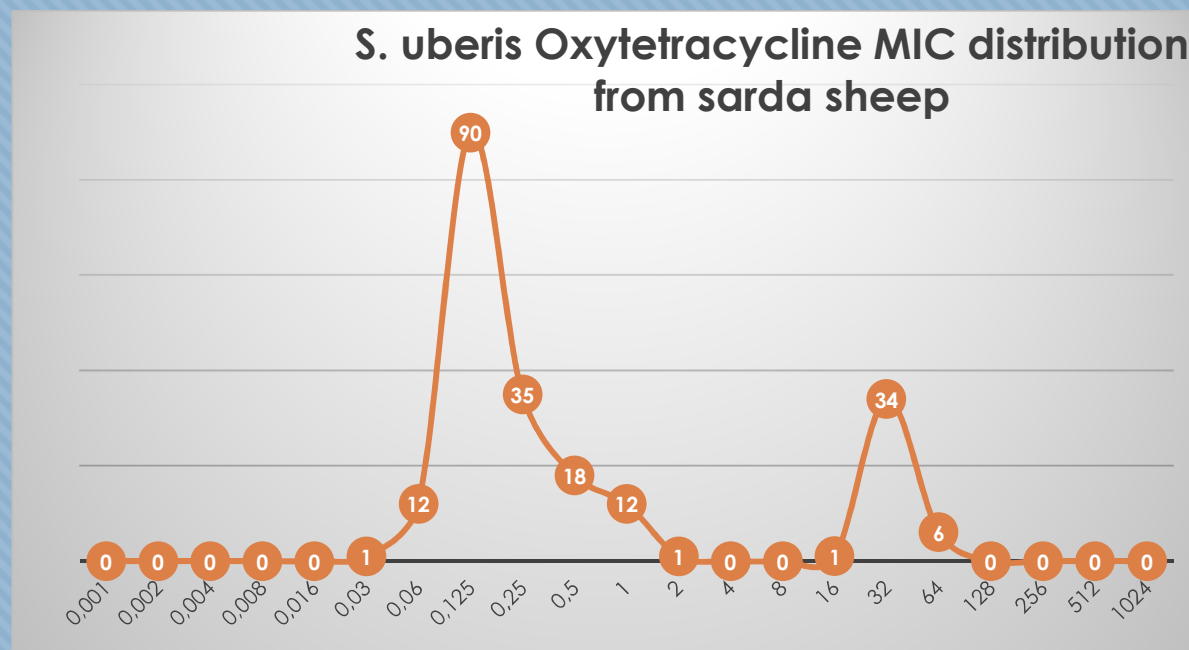
Tutti gli isolati (N= 210) saggiati per la MIC vs. OTC e TET con **microdiluizione in brodo (ISO 20776)** e **test di diffusione in agar** su Mueller-Hinton sangue (Eucast; CLSI VET01); 2 UO coinvolte.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Distribuzione delle MIC nei ns *S. uberis*



Distribuzione MIC per OTC bimodale (ceppi *S* separati da R);
MIC range: 0.031-64 µg/ml, mode: 0.250 µg/ml × *S* e 32 µg/ml × *R*;
MIC50 (mediana): 0.25 µg/ml, MIC90: 32 µg/ml.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Ecoff

Metodi per stabilire l'Ecoff

- Statistico
- Basato sulla distribuzione; visivo



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Ecoff

Statistico

Metodo iterativo di interpolazione delle MIC osservate dopo una trasformazione log-normale (la trasformazione dei dati in \log_2 in genere converte la curva delle MIC in curva 'normale')

Si impiega un foglio di calcolo Excel (*)

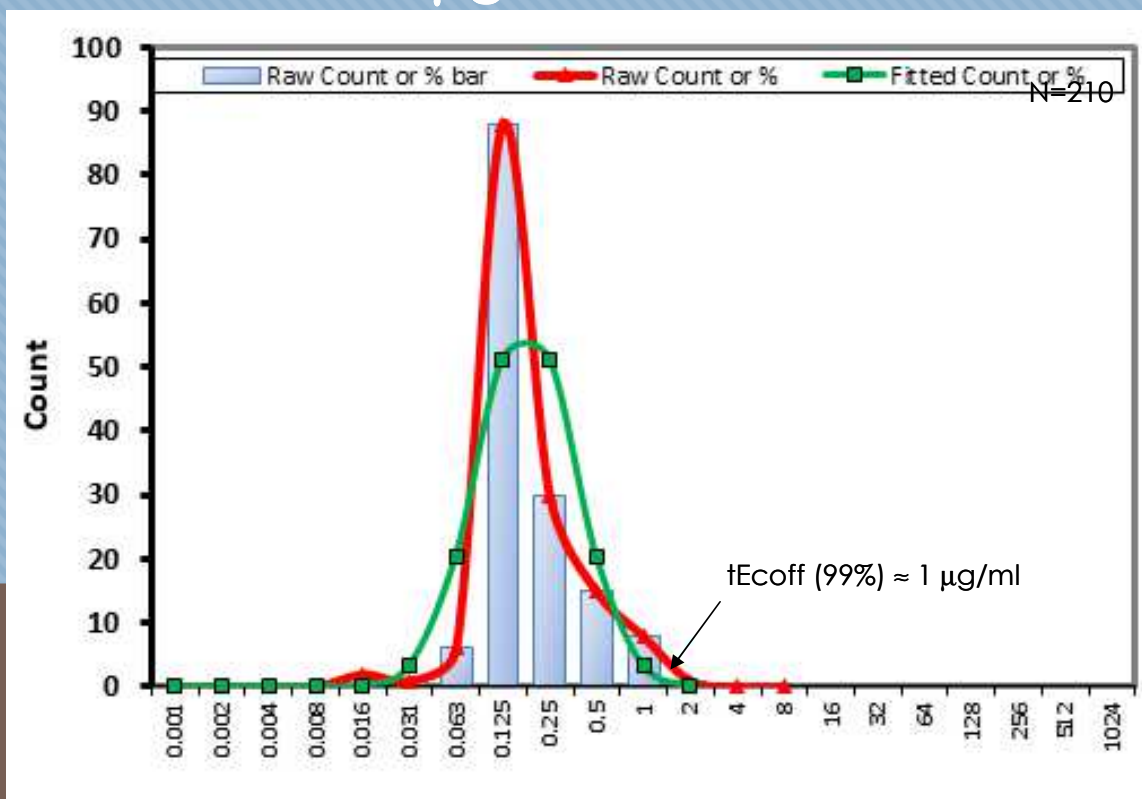
(*) Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Clin Microbiol Infect 2006; 12:418-25



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Distribuzione 'ricostruita' delle MIC di *S. uberis* da pecore sarde e (tentative) Ecoff 99% → 1 µg/mL





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



% dei nostri ceppi S con MIC \leq tEcoff di 1 $\mu\text{g/mL}$

MIC	Cumulative_frequency	%
≤ 0.001	0	0
≤ 0.002	0	0
≤ 0.004	0	0
≤ 0.008	0	0
≤ 0.016	0	0
≤ 0.031	1	1
≤ 0.063	13	8
≤ 0.125	103	61
≤ 0.25	138	82
≤ 0.5	156	92
≤ 1	168	99
≤ 2	169	100
≤ 4	169	100



Ampliamo un po' il campione ...

☰

MIC EUCAST

Login

Antimicrobial wild type distributions of microorganisms

Mic distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

Search database

Method

Antimicrobial

Species

Streptococcus uberis

● MIC ● Disk diffusion

Elements per page 50

MIC distributions for Streptococcus uberis, 2022-12-09

Species: Streptococcus uberis (Method: MIC)

	0.002	0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Distributions	Observations	(T)ECOFF	Confidence interval
Benzylpenicillin	0	0	0	9	12	0	2	13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	39	ID	
Cefalexin	0	0	0	0	0	0	0	6	29	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	39	ID	
Cefazolin	0	0	0	0	0	8	43	23	10	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	97	ID	
Cefoperazone	0	0	0	0	0	5	11	53	6	3	18	1	0	0	0	0	0	0	0	1	97	-	
Ceftiofur	0	0	0	0	17	8	50	1	1	17	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	97	ID	
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	14	76	98	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	192	ID	
Clindamycin	0	0	0	0	20	66	10	5	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	139	0.25	0.06 - 0.25
Tetracycline	0	0	0	0	0	0	6	32	115	7	4	2	1	3	9	42	77	4	2	2	304	-	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	0	0	0	1	1	11	104	94	22	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	236	1	0.25 - 1
Tulathromycin	0	0	0	0	0	0	0	2	41	64	11	1	0	4	0	13	0	0	0	2	136	ID	
	0.002	0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Distributions	Observations	(T)ECOFF	Confidence interval
Vancomycin	0	0	0	0	0	0	0	7	89	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	97	ID	

© MIC EUCAST 2022.

Disclaimer Privacy Statement Contact



Distribuzione Eucast per TET ha MIC più elevate →
% dei S con MIC \leq tEcoff di 1 $\mu\text{g/mL}$ = 96%

MIC (EUCAST)	Cumulative_frequency	%
≤ 0.001	0	0
≤ 0.002	0	0
≤ 0.004	0	0
≤ 0.008	0	0
≤ 0.016	0	0
≤ 0.03	0	0
≤ 0.06	0	0
≤ 0.125	6	4
≤ 0.25	38	23
≤ 0.5	153	92
≤ 1	160	96
≤ 2	164	98
≤ 4	166	99
≤ 8	167	100

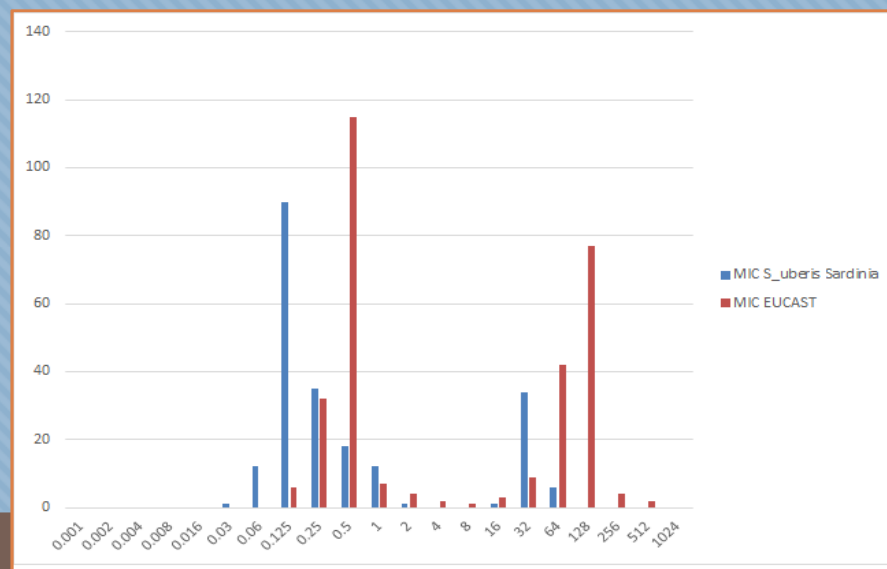
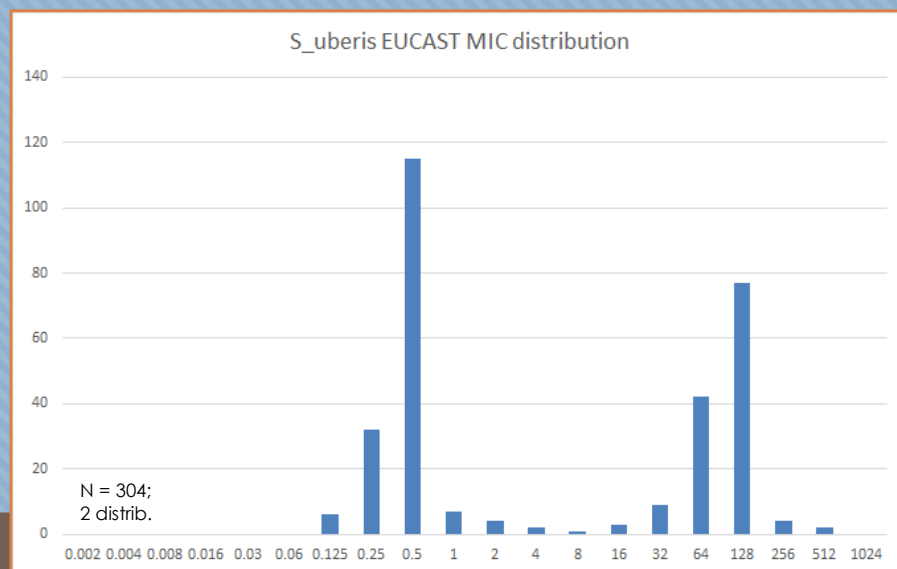


ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Distribuzione Eucast ha MIC più elevate

MIC *S. uberis* Eucast vs. MIC *S. uberis* da pecore sarde





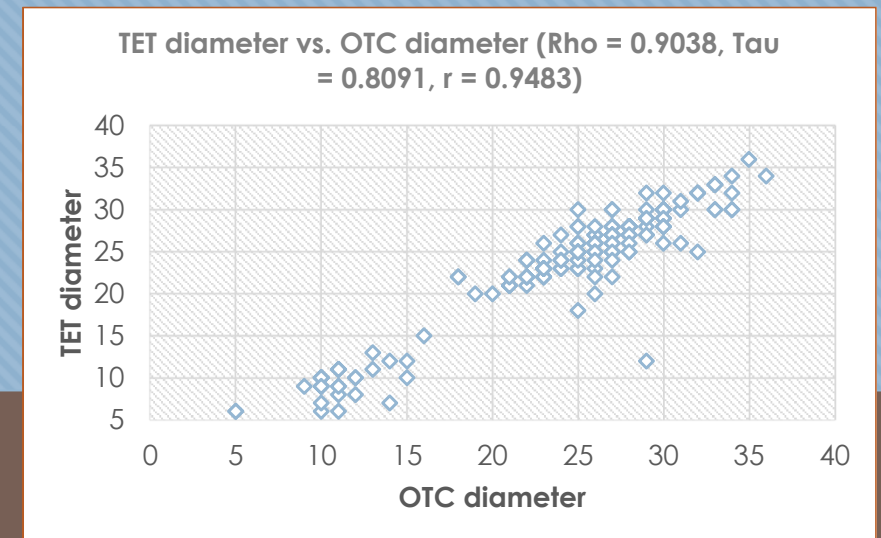
Distribuzione congiunta (MIC *S. uberis* Eucast + ns distribuzione
→ **tEcoff 99% = 2 µg/mL** (è il valore che adotteremo nella
discussione)

MIC	Frequency (ours+Eucast)	Cumulative_frequency	%
≤0.001	0	0	0
≤0.002	0	0	0
≤0.004	0	0	0
≤0.008	0	0	0
≤0.016	0	0	0
≤0.03	1	1	0.3
≤0.06	12	13	3.9
≤0.125	96	109	32.4
≤0.25	67	176	52.4
≤0.5	133	309	92.0
≤1	19	328	97.6
≤2	5	333	99.1
≤4	2	335	99.7
≤8	1	336	100
≤16	4	340	
≤32	43	383	
≤64	48	431	
≤128	77	508	
≤256	4	512	
≤512	2	514	
≤1024	0	514	



Giustificazione: equivalenza MIC OTC e MIC TET (*)

Ranghi / Tet_MIC-OTC_MIC	N	Rango medio	Somma di ranghi
Negativi	37	23.2703	861.0000
Positivi	17	36.7059	624.0000
Legati	85		
Test dei ranghi con segno di Wilcoxon			
N	139		
N-Legati	54		
T	624		
Z	-1.0203		
p-value a due code	0.3076		
Z (Corrected for ties)	-1.0292		
p-value a due code	0.3076		
Test di Segno			
N-Legati	54		
N+	17		
min [N-,N+]	17		
Z	-2.5856		
p-value (Z) a due code	0.0097		



(*) Lees P. et al, The Veterinary Journal, 218, 2016, 60–64 → CLSI



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Wilcoxon per MIC:

Calcolato sia l'indice W che Z; il campione è > 20 e W tende a una distribuzione normale \rightarrow tende a Z

W-value = 116.5; below critical value for W = 89 ($p < .05$) is 89.

The result is not significant at $p < .05$

Z-value = 1.2377 (p-value = 0.21); The result is not significant at $p < .05$.

CLSI VET01-A4, 2013; Dorey, L., Pelligand, et al., J. vet. Pharmacol. Therap.

doi: 10.1111/jvp.12385



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



MIC TET = MIC OTC

**Conferma che le MIC vs. TET e MIC vs. OTC sono sovrapponibili
(*)**

(*) CLSI VET01-A4, 2013; Dorey, L., Pelligand, et al., J. vet. Pharmacol. Therap.

doi: 10.1111/jvp.12385



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



tEcoff assunto

2 $\mu\text{g/mL}$ è il valore che assumeremo ai fini della
presente discussione
(comprende il 99% della distribuzione dei 'sensibili')



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Somministrazione

10 pecore sane in lattazione + 10 pecore affette da mastite sono state sottoposte ad una singola somministrazione di ossitetraciclina (Terramycin®-LA, Zoetis Italy al fine di ottenere una dose corrispondente a 20 mg/kg, sufficiente a garantire 3-5 giorni di terapia

Autorizzazione Ministeriale n. 916/2017/PR



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



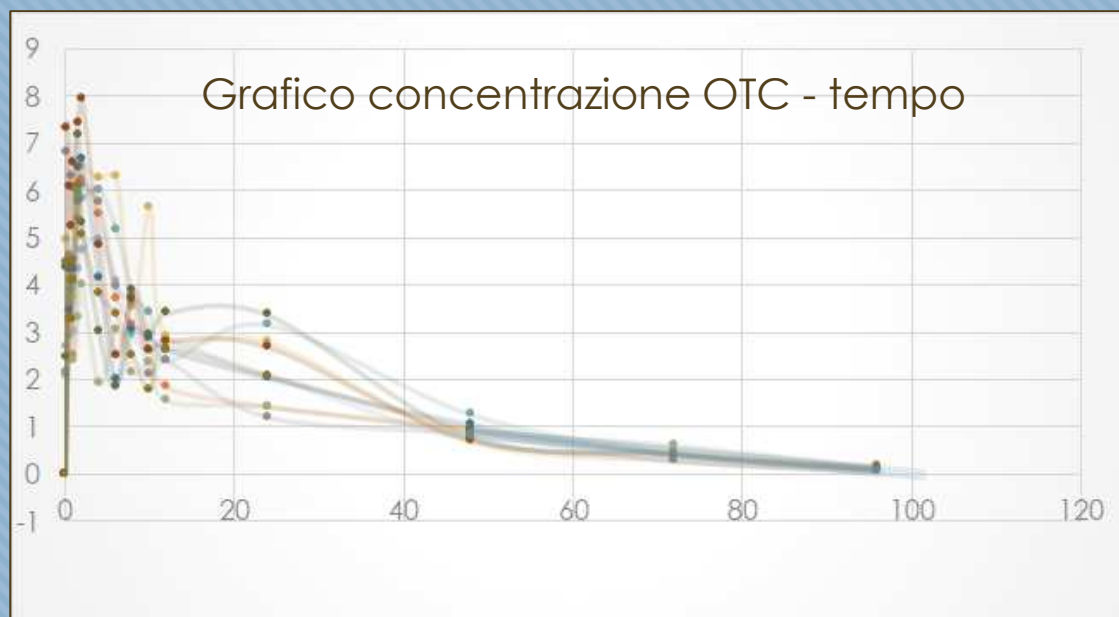
M & M chimica

La ricerca della
ossitettraciclina nel siero e
latte è stata fatta mediante
HPLC





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Si è quindi proceduto all'elaborazione dei dati in 3 modi ...



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Elaborazione
concentrazione
OTC

Elaborazione PK/Pd condotta tramite

- Analisi Non-compartmentale (NCA)
parametri PK/PD calcolati dalle concentrazioni OTC osservate
- Modello compartimentale
'modellizza' le concentrazioni di OTC nei distretti corporei per predire (dedurre) i parametri PK/PD
- Simulazione Monte Carlo
ri-campionamento casuale che, sulla base del modello, generi una 'popolazione' statistica più ampia su cui basare/confermare le stime dei parametri PK/PD



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Elaborazioni condotte con i programmi

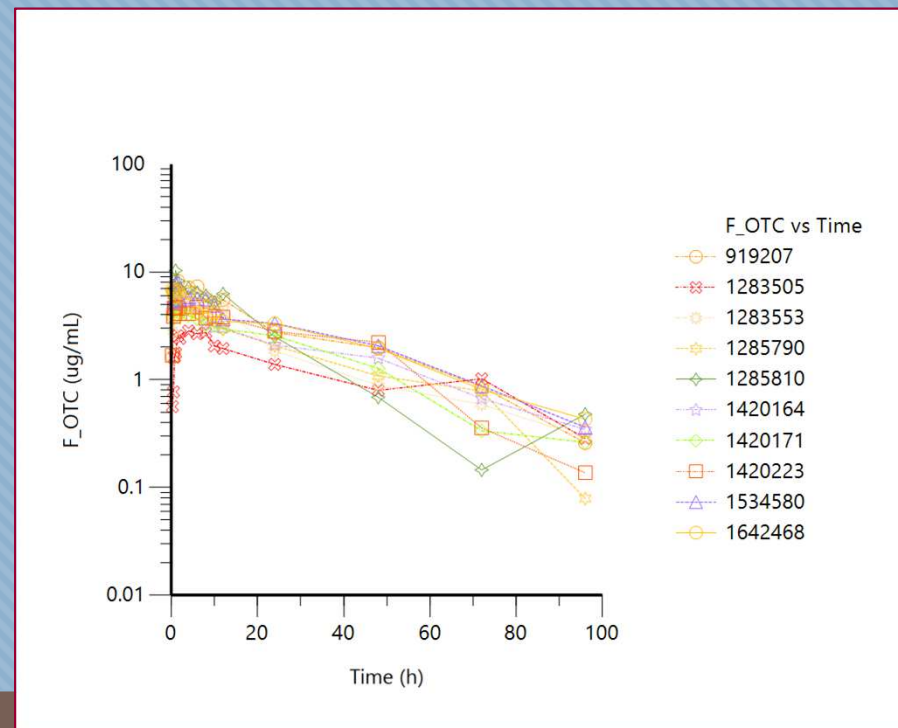
- **Phoenix 64, Certara (USA)**
- Excel, Microsoft
- Crystal Ball, Oracle



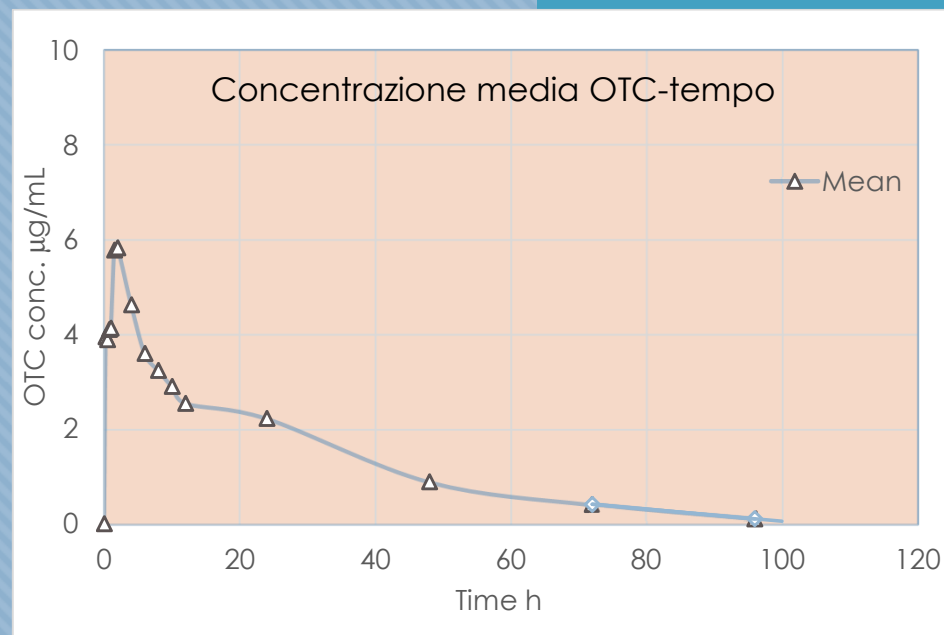
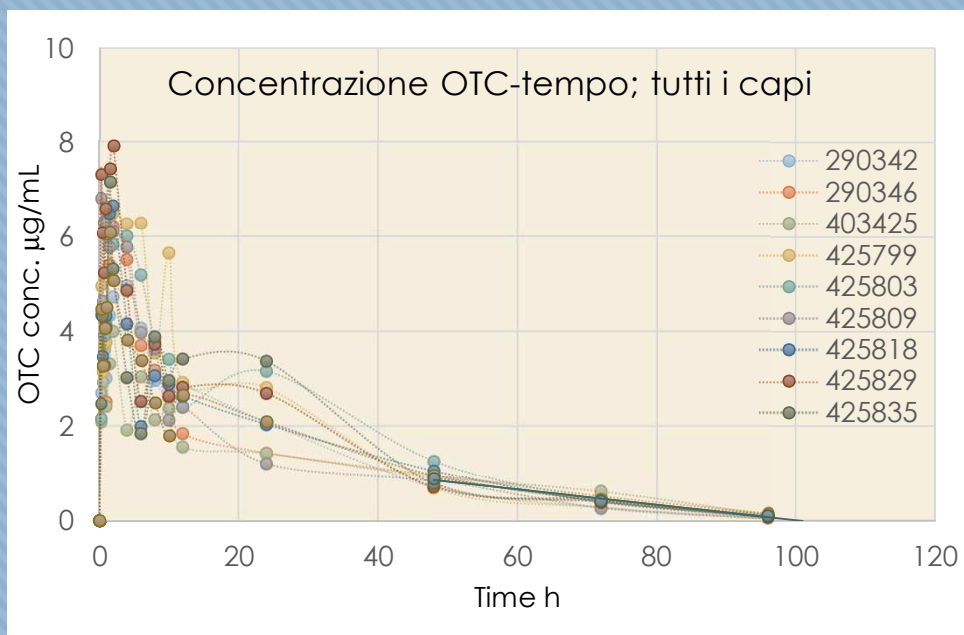
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Elaborazione
concentrazione
OTC



'Spaghetti plot' e ricerca di (eventuali) outliers



Analisi NCA: Evoluzione nel tempo della concentrazione **osservata** della OTC nel siero



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Analisi NCA

La Cmax della OTC nelle pecore sane è stata di 6.23 µg/ml (range 3.99-7.9) raggiunta al Tmax di 2.12 h dopo la somministrazione (range 0.25–4 h).

La concentrazione della OTC persisteva sopra il tWT cutoff (2 µg/ml) per 24.6 h

Si è stimato per estrapolazione che la concentrazione arriva a 0 a 100.293 h (100 h e 17 min)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Analisi NCA

Di regola, il cutoff PK/PD è calcolato per l'efficacia nel 90% dei casi.
Consideriamo allora il quantile 10
(escludiamo il 10% degli animali alla coda sinistra distribuzione
dell'AUC₁₂₀), che è = **105 g*h/mL**

La MIC che il batterio infettante non deve superare è quindi $(105/120 =)$
0.875 ovvero \approx **1.0 $\mu\text{g/mL}$** (per avere efficacia nel 90% dei casi)

Ciò significa che, per prevedere l'efficacia in almeno il 90% delle pecore,
la MIC del ceppo non dovrebbe essere superiore a **1.0 $\mu\text{g/mL}$**

(il breakpoint CLSI che individua i S è 2 mg/L)



- È stato generato un modello PK/PD extravascolare a 2 compartimenti ed effetti misti (fissi e casuali) senza 'covariate'
- La concentrazione di OTC nel plasma è stata modellata come:

$$C(t) = A * e^{(-Alpha*t)} + B * e^{(-Beta*t)} - (A + B) * e^{(-K_a*t)}$$

ovvero:

$$C(t) = 4.43 * e^{(-0.03*t)} + 0.99 * e^{(-0.33*t)} - (5.42) * e^{(-3.76*t)}$$

$C(t)$: concentrazione di OTC al tempo t

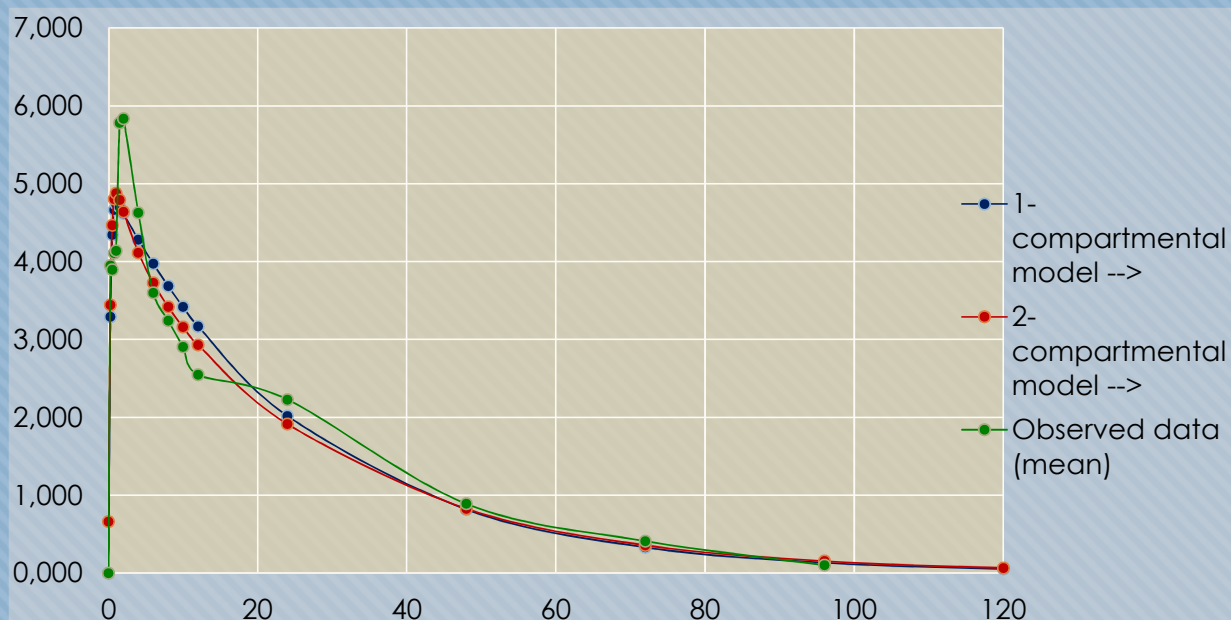
Alpha: fattore legato alla K di distribuzione; Beta: fattore legato al tasso di eliminazione; A intercetta della curva di distribuzione; B intercetta di eliminazione; K_a : K di assorbimento



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



2-compartmenti



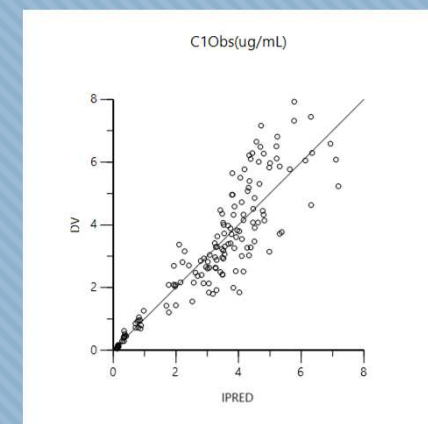
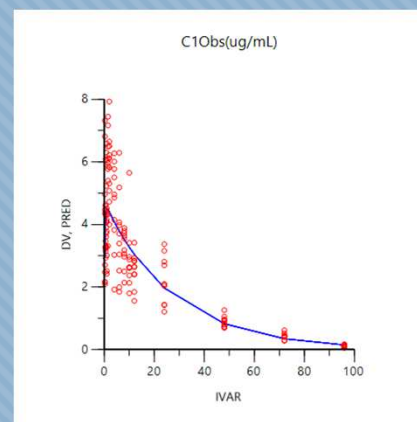
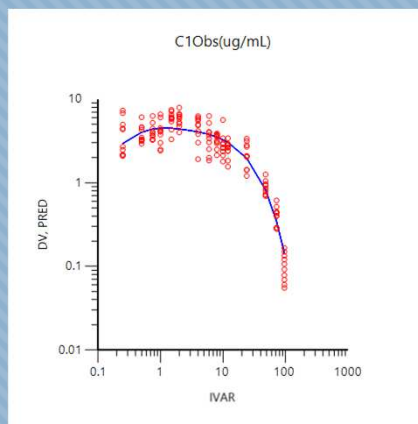
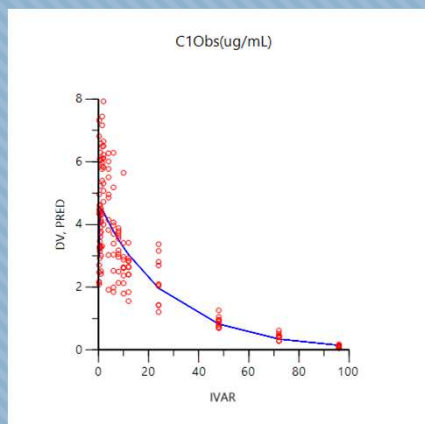
**Andamento della concentrazione vs. tempo
predetto dal modello e confronto coi dati osservati**



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Verifica
grafica del
modello 2-



Verifica grafica del modello Concentrazione predetta (**blu**) vs. osservata (**rosso**)

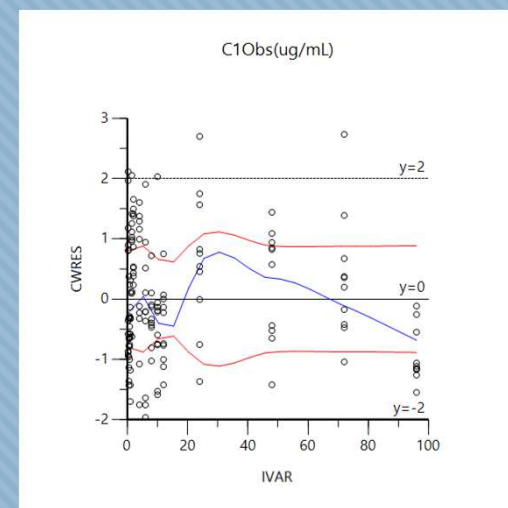
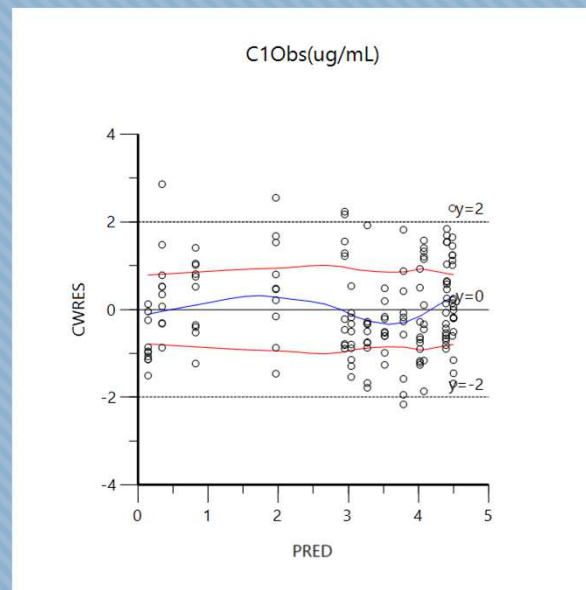
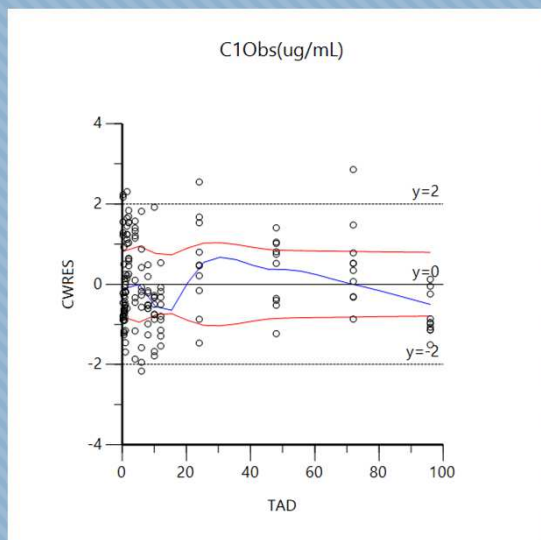
(DV, dependent variable = concentrazione; iVar, independent variabile = tempo; Pred = predetto)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Verifica
grafica del
modello 2-



Distribuzione dei residui

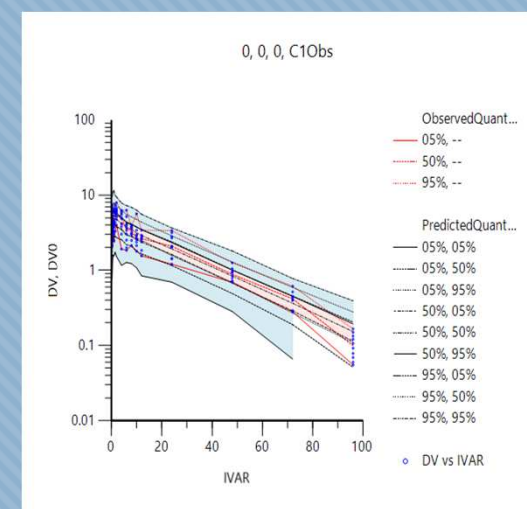
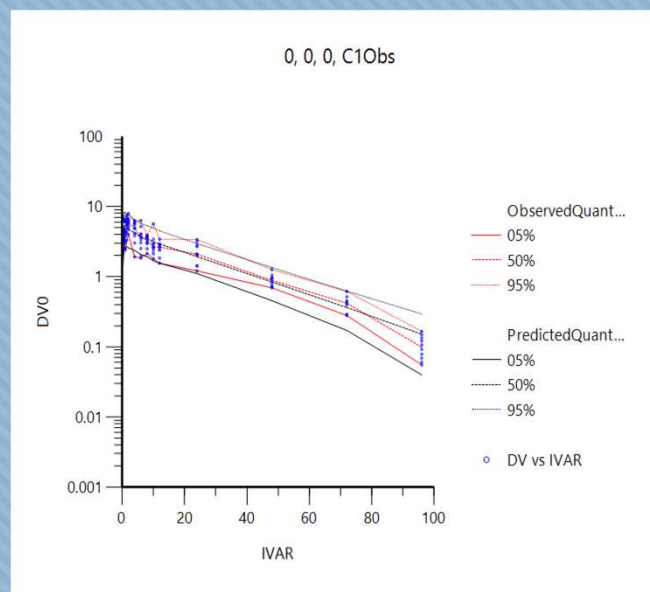
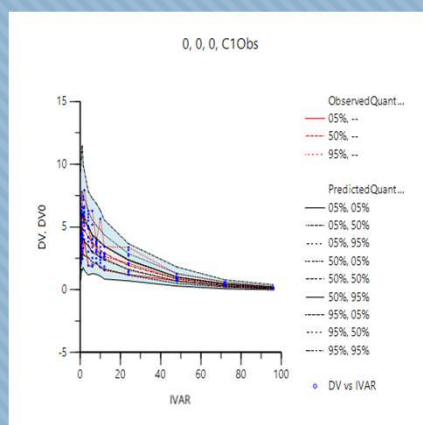
(CWRES: conditional weighted residuals; TAD: Time after dose administration;
PRED: population predictions)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Verifica
grafica del
modello 2-



Grafici 'di previsione': valori predetti e intervalli di
confidenza ai diversi tempi vs. valori osservati



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Monte Carlo

Simulazione Monte Carlo

Sulla base del modello è stata fatta una simulazione col metodo Monte Carlo

Metodo usato per trarre stime attraverso simulazioni.

Si basa sulla generazione di una più ampia gamma di eventi a partire dal modello. Una sorta di ricampionamento che estende la 'popolazione' statistica sulla quale basare le previsioni.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Monte Carlo

Esempio: si sa dalle teoria che il lancio di due dadi può produrre 36 combinazioni (teoriche, analitiche) ciascuna delle quali con una certa probabilità.

Una simulazione Monte Carlo, sulla base di queste probabilità teoriche, può essere usata per avere con più precisione le probabilità delle combinazioni dopo, per esempio, 10 mila (o più) lanci.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Monte Carlo

Risultati della simulazione

- Mediana e quantili per la AUC coincidono con quelli della NCA iniziale
- il percentile 10 è risultato 104 h* $\mu\text{g/mL}$ (in NCA era 105)
- il cutoff da non superare per il successo nel 90% dei casi è stato quindi 1.06 per il 0.87, ovvero $\approx 1 \mu\text{g/mL}$ (in NCA era 0.875 $\mu\text{g/mL}$) pressoché invariati rispetto alla iniziale NCA.

Ovvero l'elaborazione Monte Carlo ha confermato quanto già ottenuto (e questo significa anche che il modello interpola bene le osservazioni)



Nelle pecore affette da mastite

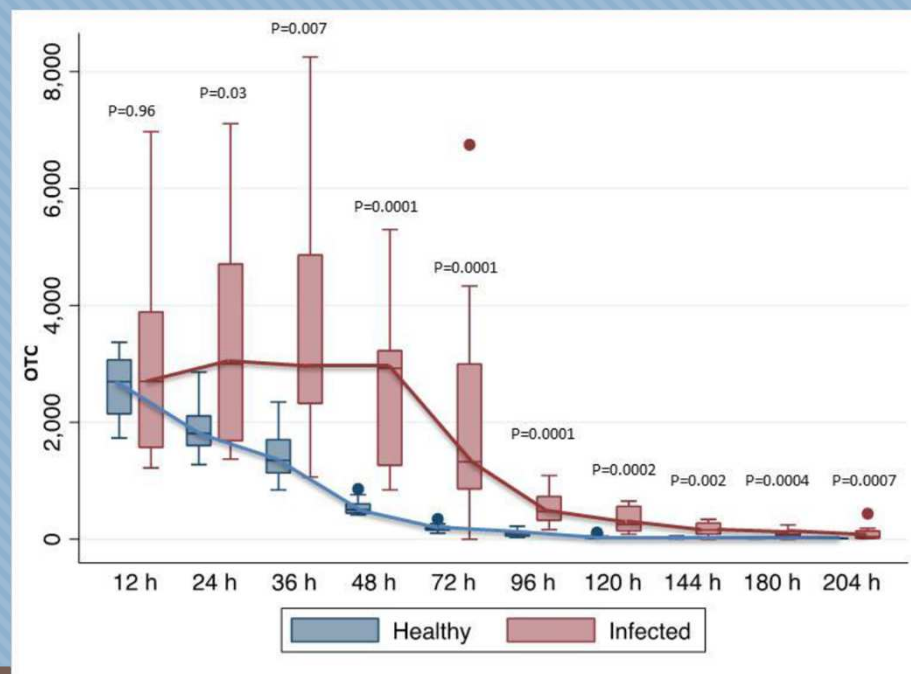
- la C_{max} è stata di $6.7 \mu\text{g/ml}$ raggiunta a 1.85 h
- il periodo in cui la concentrazione dell'OTC è rimasta $>$ il WT cutoff è stato di 33,7 h (ca. 10 h in più rispetto ai sani)
- la C del farmaco tocca 0 a 105 ore e 29 minuti
- AUC media è stata di $1.4 \text{ g}^*\text{h/mL}$ nelle 120 h, ovvero $\approx 1 \mu\text{g/mL}$, non diverso da quanto visto prima



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



OTC nel
latte



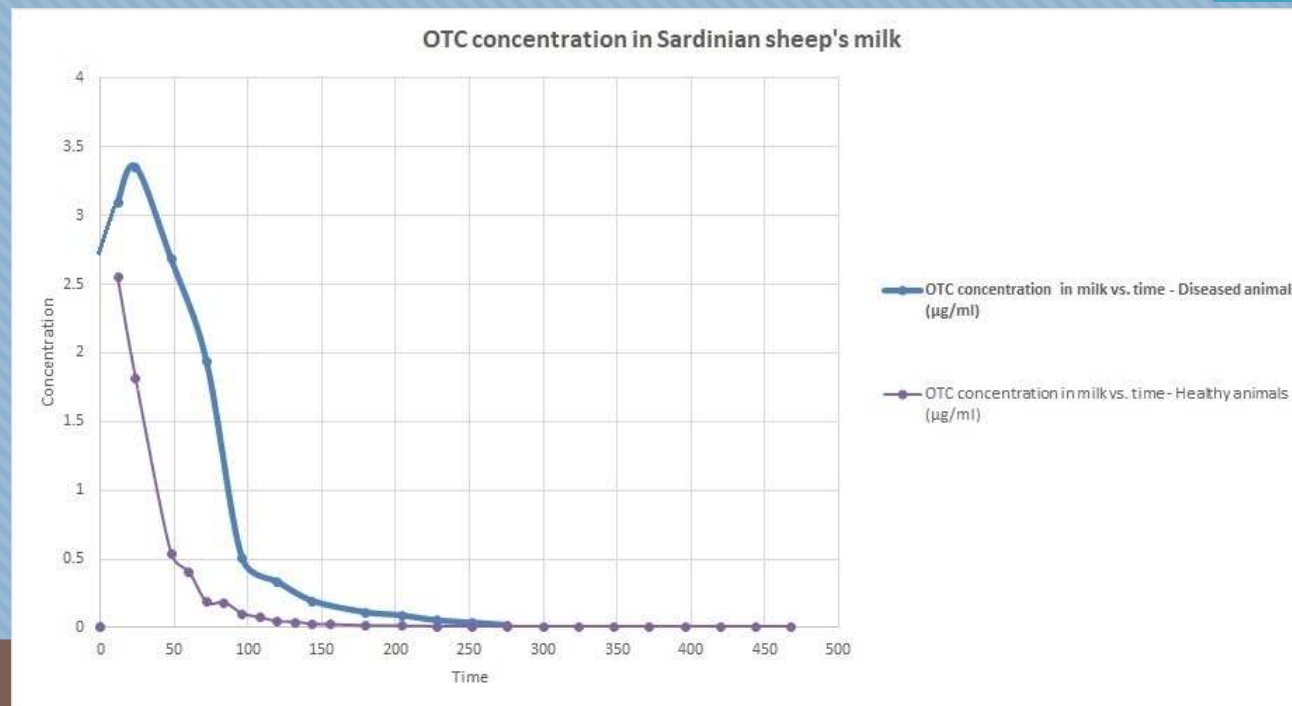
Concentrazione di oxytraciclina ($\mu\text{g/Kg}$) nel latte di
dei capi sani e infetti durante il periodo di follow-up



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



OTC nel
latte



$C_{max} = 2.5 \mu\text{g/mL}$ nelle pecore sane; $3.4 \mu\text{g/mL}$ nelle pecore affette da mastite



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Conclusioni

Conclusioni



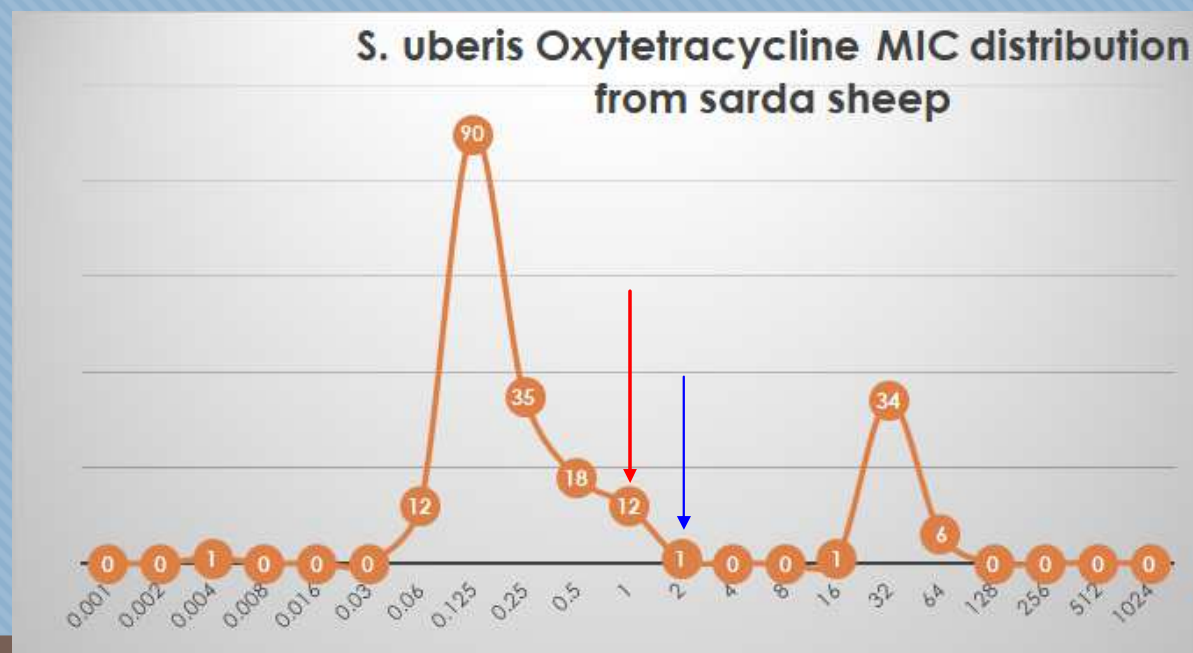
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Cutoff dei 'resistenti' che ne risulta



Cutoff delle R

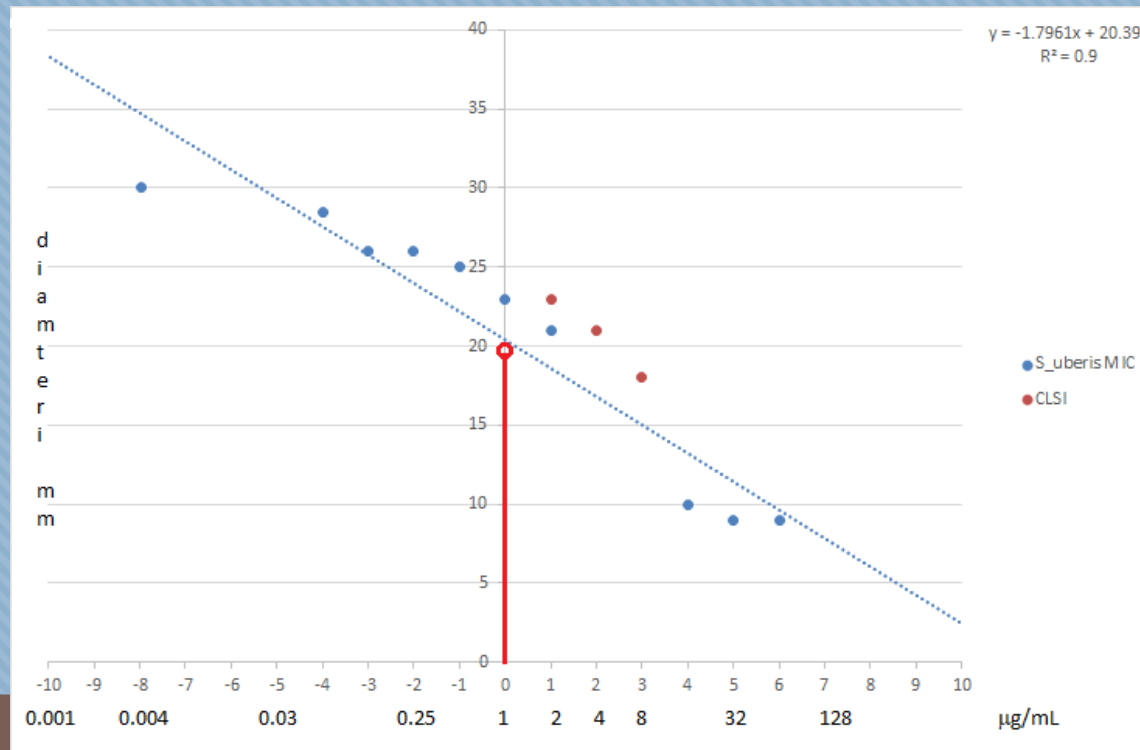




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Diametri KB



A cui corrisponde questo diametro (19 mm) nei test di
diffusione in agar



Table 2D. *Streptococcus* spp. (Continued)

Test/ Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Organism	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
					S	I	R	S	I	R	
Tetracyclines (Continued)											
		Tetracycline	<i>Streptococcus</i> spp., other than <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	30 µg	≥23	19–22	≤18	≤2	4	≥8	(42) Tetracycline tested as the class representative for susceptibility to chlortetracycline, doxycycline, minocycline, and oxytetracycline. ^b Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline or minocycline or both.
			<i>S. pneumoniae</i>		≥28	25–27	≤24	≤1	2	≥4	
		Doxycycline	<i>S. pneumoniae</i>	30 µg	≥28	25–27	≤24	≤0.25	0.5	≥1	

Diverso dal diametro CLSI



- Il modello costruito ha dimostrato di simulare bene le osservazioni
- i limiti interpretativi per la resistenza si sono rilevati diversi da quelli assunti (CLSI)
- Può essere generalizzato e impiegato in altre condizioni (una volta nota la distribuzione delle MIC dei patogeni; es. anche per infezioni sistemiche da *Pasteurella* e malattie polmonari)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



**Vorrei ringraziare tutti coloro che dell'IZS Sardegna
hanno contribuito:**

**Agnese Cannas, Simone Dore, Roberta Mazza
Vittoria D'Ascenzo
Severyn Salis, Nicola Rubattu, Cecilia Testa**

Ricordando Cecilia



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Un Grazie a tutti Voi per l'attenzione