

Introduzione da parte dei laboratori di microbiologia in Svizzera della norma EUCAST per determinare la sensibilità agli antibiotici: implicazioni microbiologiche e cliniche

Jacques Bille (Losanna) – *Presidente Swiss Antibigram Committee (SAC)*

Reinhard Zbinden (Zurigo) – *Segretario SAC, Presidente della Società Svizzera di Microbiologia (SSM)*

INTRODUZIONE

La determinazione in vitro della sensibilità dei batteri agli antibiotici è indispensabile per guidare l'antibiotico-terapia in quanto permette da un lato di intervenire in modo mirato sulla terapia del singolo paziente e dall'altro, grazie alla conoscenza delle sensibilità locali, facilita la prescrizione empirica di un antibiotico. Dal punto di vista epidemiologico, essa permette di seguire l'evoluzione delle resistenze agli antibiotici a livello locale (ospedale) o nazionale (in modo particolare grazie al programma anresis: www.anresis.ch). Per eseguire questi antibiogrammi sono stati sviluppati e standardizzati diversi metodi: i test di diffusione (mediante i dischetti o usando gli Etest®) e i test di diluizione in brodo (microdiluzione) come quelli usati da certi automatici (Vitek 2, Phoenix, Microscan) spesso accompagnati da un "sistema esperto".

In Svizzera da molti anni l'interpretazione di questi test (S per sensibile, R per resistente e I per intermedio o indeterminato) si basa su delle concentrazioni critiche (breakpoints) stabilite dal comitato americano CLSI (in precedenza NCCLS).

In Europa molti paesi hanno sviluppato i propri metodi e criteri di interpretazione (BSAC nel Regno Unito, CA-SFM in Francia, CRG nei Paesi Bassi, DIN in Germania, NWGA in Norvegia e SRGA in Svezia). Qualche anno fa, un comitato di esperti appartenente alla Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive (ESCMID) ha armonizzato questi lavori e ha sviluppato una metodologia unica per testare la sensibilità dei microrganismi agli antibiotici. Questo comitato (EUCAST per European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) propone una metodologia unificata per l'insieme dei paesi europei.

Organizzazione e obiettivi di EUCAST

EUCAST è formato da un comitato allargato (General Committee) che include un rappresentante designato ufficialmente da ogni paese e da un comitato

direttivo (Steering Committee) che comprende un rappresentante di ogni comitato nazionale esistente e due delegati del comitato generale. EUCAST ha dei legami stretti con EMEA (European Medicines Agency) e ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) e include anche un gruppo di esperti ad-hoc e dei sotto comitati per gli antimicotici, i batteri anaerobi e i sistemi esperto.

I principali obiettivi di EUCAST sono:

- Stabilire i valori critici (clinical breakpoints) per gli agenti antimicrobici attuali e futuri in collaborazione con ESCMID, EMEA e ECDC
- Sviluppare dei metodi standardizzati per saggiare la sensibilità agli agenti antimicrobici e delle procedure di controlli di qualità interne

Altri obiettivi mirano a:

- Definire la distribuzione delle concentrazioni minime inibitrici (CMI) dei ceppi "wild type" per ogni specie batterica o fungina
- Interagire con organizzazioni come EMEA, ECDC, EFSA (European Food Safety Authority) e EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) come pure con i comitati nazionali implicati nella determinazione dei test di sensibilità e di resistenza

Per la Svizzera il partner di EUCAST è il SAC (Swiss Antibigram Committee) creato nel giugno del 2010 da un gruppo di lavoro della Società Svizzera di Microbiologia (SGM/SSM <http://www.swissmicrobiology.ch>). Questo comitato comprende anche dei rappresentanti designati dalla Società Svizzera di Malattie infettive, dalla Società Svizzera di Igiene Ospedaliera, da Swissnos e dal gruppo Anresis.

Il ruolo principale del SAC è quello di aiutare i laboratori ad adottare la metodologia EUCAST e di esaminare le implicazioni di questa implementazione non solo a livello del laboratorio ma anche dal lato della terapia antibiotica e delle misure epidemiologiche e

di controllo delle infezioni.

Rispetto alla norma CLSI, la norma EUCAST offre un certo numero di vantaggi:

- Si basa su delle indicazioni di antibiotico terapia approvati dall'EMA e sui dosaggi utilizzati in Europa
- È indipendente da qualsiasi interesse commerciale, trasparente e comprensibile
- È accessibile gratuitamente
- È revisionata regolarmente grazie all'iniziativa di numerosi partner (EMA, EUCAST, compagnie farmaceutiche)

EUCAST in Svizzera

Nel quadro dell'armonizzazione in Europa, la Società Svizzera di Microbiologia ha deciso, come la maggior parte dei paesi Europei, di proporre ai laboratori di microbiologia svizzeri l'introduzione delle regole EUCAST nel 2011. In quest'ottica, sono state organizzate delle riunioni informative (assemblea annuale 2009 della SSM a Losanna, riunione di diagnostica in microbiologia in giugno 2010 a Berna) e ha creato il SAC nel luglio 2010 con l'obiettivo

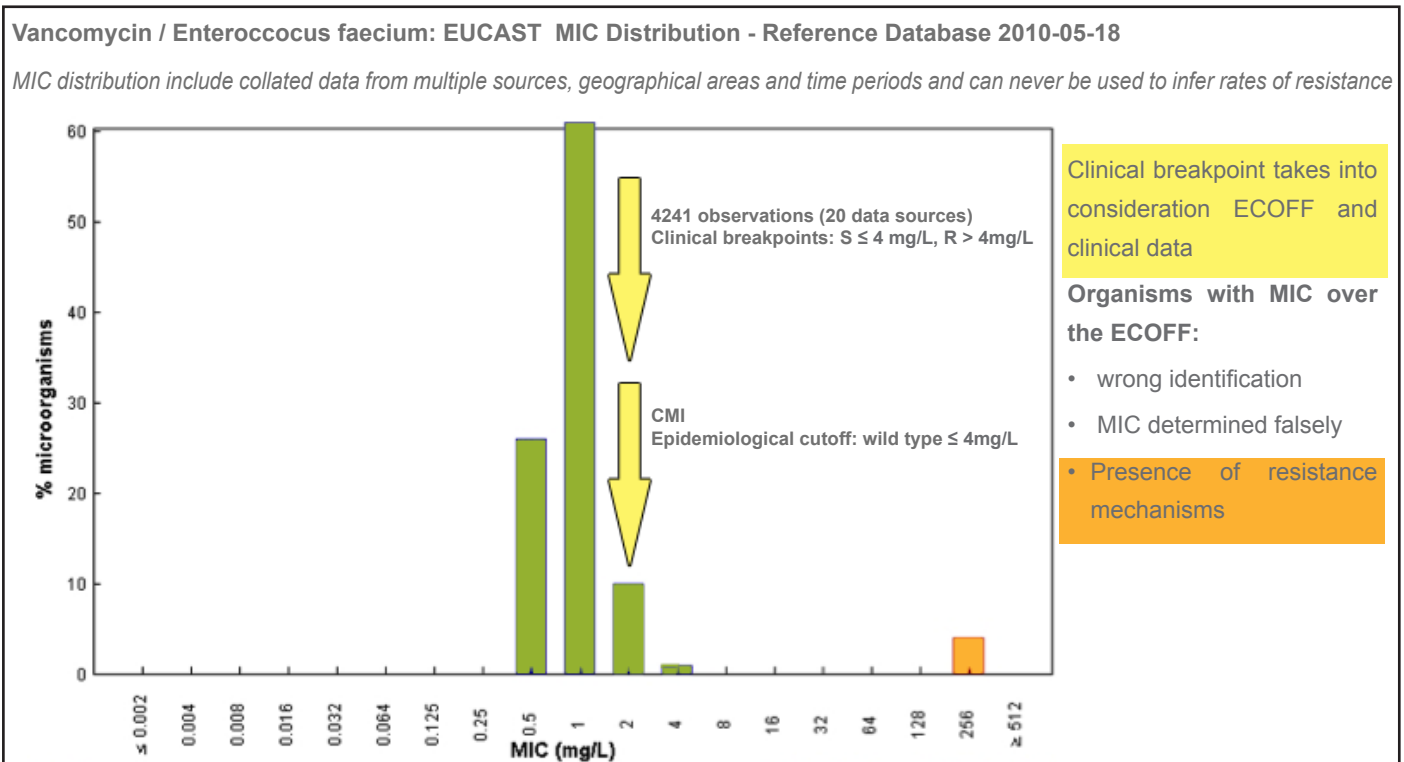
di preparare i documenti principali per i laboratori (<http://www.swissmicrobiology.ch>) e di discutere con i partner principali (Società Svizzera di malattie infettive, Società Svizzera di Igiene Ospedaliera, Swissnoso, Anresis) le ripercussioni delle nuove raccomandazioni sul piano clinico ed epidemiologico (Club di patologia infettiva in gennaio 2010 e 2012, presentazioni accessibili sul sito della SSM).

Metodologia EUCAST

Il processo seguito da EUCAST per permettere la determinazione dei valori critici (clinical breakpoints) è complesso e si basa su numerosi parametri:

- La/le posologia/e dell'antibiotico considerato
- Il tipo di microorganismo
- La distribuzione delle CMI tra gli organismi privi di meccanismi di resistenza, che definisce la cosiddetta "wild type distribution", un concetto fondamentale e originale per EUCAST
- Il secondo concetto fondamentale di EUCAST è quello di assumere che questa popolazione wild type non può essere artificialmente separata in due da concentrazioni critiche. Questa distribuzione

Figura 1: Principio ECOFF. Esempio con la CMI della vancomicina per *Enterococcus faecium*



EUCAST Workshop Annual Meeting St. Gallen, R. Zbinden, 22.06.2012

definisce un valore di CMI massimo per i ceppi di una data specie in assenza di meccanismi di resistenza. Questo valore CMI è denominato ECOFF per Epidemiological CutOFF (Figura 1).

- I meccanismi di resistenza e le CMI corrispondenti
- Le indicazioni cliniche
- I valori di farmacocinetica (C_{max}, AUC, T_{1/2}, legame con le proteine, volume di distribuzione) e di farmacodinamica (C_{max}/CMI), AUC/CMI, Monte Carlo Simulation)
- La risposta clinica rispetto a una dato valore di CMI

METODI

EUCAST ha standardizzato essenzialmente i metodi fenotipici come la determinazione della CMI su agar o in brodo come pure i diametri critici per il metodo di diffusione con i dischetti e gli adattamenti per gli automatici (Vitek, Phoenix, Microscan). Questi metodi sono riproducibili, quantificabili e predicono sensibilità e resistenza.

EUCAST fornisce delle tavole per ogni microrganismo e antibiotico. Rispetto alle tavole CLSI; bisogna notare che EUCAST per i valori critici (breakpoints) utilizza “≤ X µg /ml” per S (sensibile) e “> Y µg /ml” per R (resistente) per le CMI, rispettivamente “≥ X mm” per S (sensibile) e “< Y mm” per R (resistente) per i diametri di inibizione.

Queste tabelle sono accessibili sul sito internet di EUCAST (www.eucast.org). Cliccando sul nome dell'antibiotico è possibile consultare il documento completo che ha portato alla definizione dei valori critici. Il sito internet fornisce inoltre tutti i documenti necessari per la realizzazione dei test e per la loro interpretazione.

Impatto a livello del laboratorio

L'implementazione della norma EUCAST comporta delle modifiche importanti rispetto alla norma CLSI usata in precedenza dai laboratori svizzeri. Queste modifiche riguardano principalmente due aspetti:

1. Le principali modifiche a livello dei laboratori tra EUCAST e CLSI sono state a livello tecnico (terreni di coltura, concentrazione dei dischetti di antibiotico, condizioni di incubazione).

Per quanto concerne il metodo di diffusione su agar (disk diffusion) sono state introdotte diverse

modifiche:

- Utilizzo di 2 terreni di coltura solidi (agar):
 - Mueller-Hinton (MH) per i batteri non esigenti (non fastidious) e
 - MH addizionato con 5% di siero di cavallo e 20 mg/L di β-NAD (MH-F) per gli streptococchi, compresi *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus spp.*, e altri microrganismi esigenti (fastidious)
 - Le placche sono incubate a 35°C ± 1°C per 18 ± 2h. in aria atmosferica (placche MH) oppure in 5% CO₂ (placche MH-F)
 - La quantità di antibiotici presenti nei dischetti è spesso diversa da quelli raccomandati dal CLSI
2. Le modifiche a livello di interpretazione dell'antibiogramma dovute ai cambiamenti delle concentrazioni critiche (breakpoints) – generalmente più basse – implicano un numero più elevato di ceppi riportato come non sensibile (o resistente) ad un determinato antibiotico. Questo tocca essenzialmente:
 - I glicopeptidi per gli stafilococchi e gli enterococchi
 - I beta-lattamici per le enterobatteriacee
 - Gli aminoglicosidi per gli stafilococchi e la resistenza ad alto livello per gli enterococchi
 - La penicillina per gli streptococchi viridanti

Al contrario, in numerose situazioni non ci sono stati cambiamenti, come per esempio:

 - La determinazione della resistenza alla meticillina negli stafilococchi dorati e a coagulasi negativa
 - Lo screening per la sensibilità dei pneumococchi alla penicillina
 - Le regole concernenti la clindamicina in caso di resistenza MLS inducibile.

Bisogna notare che la norma CLSI è pure stata modificata nel 2010 per certo numero di concentrazioni critiche (in modo particolare per i beta-lattamici nei bacilli Gram negativi) e quindi queste differenze a volte importanti nelle versioni precedenti sono state per la maggior parte livellate con la nuova revisione (vedi sotto).

Stafilococchi e glicopeptidi

Con l'aumento graduale della proporzione di *Staphylococcus aureus* resistenti alla meticillina (e a tutti i beta-lattamici) il ricorso ai glicopeptidi e in modo particolare alla vancomicina è frequente, e la determinazione in vitro della sua attività sugli stafilococchi avviene in modo sistematico.

EUCAST e CLSI hanno entrambi abbassato il valore critico di sensibilità degli *S. aureus* alla vancomicina a $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ con lo scopo di non refertare come sensibile un ceppo che potrebbe presentare una resistenza parziale come i ceppi detti "hetero VISA" (hVISA) o VISA (Vancomycin Intermediate *S. aureus*).

La filosofia di EUCAST è in effetti quella di identificare in prima intenzione tutti i ceppi non completamente sensibili e di proporre in seconda intenzione e secondo i bisogni dei test complementari per i ceppi clinicamente significativi non completamente sensibili (con una CMI superiore a $2 \mu\text{g/ml}$).

Bisogna notare che CLSI propone lo stesso valore critico per un ceppo sensibile (CMI $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) ma distingue dei valori intermedi (CMI tra 4 e $8 \mu\text{g/ml}$). L'impatto di questi nuovi valori critici sull'utilizzo di altri antibiotici oltre ai glicopeptidi (linezolid, daptomicina) e sulle misure di prevenzione delle infezioni dovrà essere monitorata con cura.

EUCAST raccomanda inoltre di non utilizzare il test di diffusione con i dischetti per valutare la sensibilità degli stafilococchi alla vancomicina, dal momento che questa tecnica non permette di differenziare gli isolati con sensibilità ridotta (hVISA o VISA) alla vancomicina da quelli completamente sensibili.

Diversi metodi sono stati proposti per rilevare i ceppi (etero)intermedi alla vancomicina. Nessuno di questi metodi risulta essere al contempo altamente sensibile e specifico, dal momento che per evidenziare questo tipo di resistenza è necessario un inoculo molto elevato. La strategia attuale è quindi quella di ridurre il numero di candidati hVISA grazie ad un metodo di screening da applicare ai ceppi con sensibilità superiore a $2 \mu\text{g/ml}$ o in caso di fallimento terapeutico anche in presenza di ceppi con delle CMI sensibili e quindi di riservare il metodo di conferma PAP (Population Analysis Profile) a un numero limitato di ceppi.

Anche per quanto concerne la teicoplanina, EUCAST raccomanda di non usare il test con i dischetti, mentre CLSI la considera un metodo valido.

Stafilococchi e altri antibiotici

EUCAST ha stabilito un valore critico di $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ come soglia per la sensibilità alla gentamicina, rispetto al valore CLSI che è invece $\leq 4 \mu\text{g/ml}$. Inoltre per il metodo con i dischetti EUCAST definisce dei diametri critici per la gentamicina diversi per *S. aureus* rispetto agli stafilococchi a coagulasi negativa.

Enterococchi e glicopeptidi

La resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi è stata scoperta nel 1986 ed è oggi diffusa a livello mondiale in modo molto variabile. Fino a qualche anno fa in Svizzera era molto ridotta con dei valori compresi tra 0% e 5%. I meccanismi di resistenza maggiormente riscontrati sono del tipo vanA (alto livello di resistenza a vancomicina e teicoplanina, trasmissione plasmidica mediante un transposon, inducibile) e vanB (resistenza variabile alla vancomicina, sensibilità alla teicoplanina, trasmissione via transposon, inducibile).

La resistenza del tipo vanA è facile da identificare in laboratorio visti gli elevati valori di CMI per i glicopeptidi (vancomicina $\geq 64 \mu\text{g/ml}$; teicoplanina $\geq 16 \mu\text{g/ml}$). Quella di tipo vanB al contrario è più difficile da mettere in evidenza (vancomicina $\geq 4 \mu\text{g/ml}$; teicoplanina 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$).

Per la vancomicina i valori di sensibilità EUCAST e CLSI sono identici per il test di diluizione (CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$) ma diversi per il metodo con i dischetti: $> 12 \text{ mm}$ per EUCAST e $> 17 \text{ mm}$ per CLSI. Questo è dovuto a delle differenze nell'esecuzione del test, in modo particolare all'utilizzo di dischetti contenenti diverse quantità di antibiotico (rispettivamente $5 \mu\text{g}$ e $30 \mu\text{g}$). EUCAST considera come resistente alla vancomicina un ceppo di enterococco con una CMI $> 4 \mu\text{g/ml}$ o con un diametro di inibizione $< 12 \text{ mm}$ mentre CLSI considera dei valori intermedi (CMI tra 8 e $16 \mu\text{g/ml}$ e diametri tra 15 e 16 mm) mentre il valore critico di resistenza è fissato a $> 32 \mu\text{g/ml}$ oppure $< 14 \text{ mm}$.

Questo significa che l'introduzione della norma EUCAST rischia di generare un aumento degli enterococchi considerati resistenti alla vancomicina rispetto alla norma CLSI.

Il metodo che utilizza gli Etest® è superiore al metodo di diffusione con i dischetti per determinare la resistenza del tipo vanB. Gli automatici hanno una buona sensibilità ($> 95\%$) per questo tipo di resistenza.

Per terminare, sono stati sviluppati dei metodi di screening utilizzabili sia per i ceppi clinici di enterococchi che per la determinazione della presenza di enterococchi resistenti alla vancomicina negli strisci rettali dei potenziali pazienti portatori.

Enterococchi e altri antibiotici

EUCAST definisce il valore critico per la resistenza ad alto livello alla gentamicina a $> 128 \mu\text{g/ml}$ mentre per CLSI è fissata a $> 500 \mu\text{g/ml}$.

Bacilli Gram negativi e beta-lattamici

Per quanto concerne l'interpretazione dei test di sensibilità per i beta-lattamici nei bacilli Gram negativi, sono stati proposti dei cambiamenti importanti da EUCAST e anche dalla revisione CLSI del 2010. In precedenza veniva testata una serie di cefalosporine con il metodo per diffusione e per diluzione e in caso di sensibilità ridotta, la presenza di una beta-lattamasi a largo spettro (ESBL) veniva ricercata direttamente o mediante un test fenotipico di conferma utilizzando l'acido clavulanico. Se il test era positivo, cioè se era rilevata la presenza di ESBL, la regola era di riportare questo isolato come resistente a tutti i beta-lattamici (penicilline, cefalosporine e aztreonam). Questo approccio comportava un ritardo nella consegna del risultato dovuta all'esecuzione dei test di conferma.

Sia CLSI (2010-2012) che EUCAST propongono

dei valori critici di sensibilità più bassi (Tabella1) che permettono quindi un migliore screening non solo della presenza di ESBL, bensì anche di altri tipi di resistenza potenzialmente più problematici sul piano clinico ed epidemiologico. Facendo così, a livello di laboratorio non è più strettamente necessario ricercare sistematicamente la presenza di ESBL con dei test supplementari e non è più necessario considerare l'insieme dei beta-lattamici come inattivi ("report what you observe").

EUCAST e CLSI indicano comunque entrambi che la ricerca di ESBL può essere utile sul piano epidemiologico e di prevenzione delle infezioni. Si tratta di una modifica metodologica importante, le cui implicazioni cliniche ed epidemiologiche non sono necessariamente ben conosciute. Considerando questa incertezza, il SAC ha espresso l'intenzione dei laboratori svizzeri di proseguire per altri 2 anni con la ricerca sistematica degli ESBL. I due prossimi anni dovrebbero permettere di accumulare le informazioni necessarie per valutare la necessità o meno di proseguire con questo screening e di mettere a punto una rete di laboratori esperti per la determinazione delle resistenze inabituali o difficilmente evidenziabili. In modo analogo anche per le carbapenemasi, la riduzione dei valori critici di sensibilità per entrambi EUCAST e CLSI (Tabella 2) implica che i test di screening per il rilevamento delle carbapenemasi

Tabella 1: Valori critici per ceftriaxone (mm, CMI), cefepime (mm, CMI), cefotaxime (CMI) e ceftazidime (CMI)

Enterobacteriaceae	CLSI 2009			CLSI 2010-2012			EUCAST 2012		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ceftriaxone 30 μg	≥ 21	14-20	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 23	20-22	< 20
Ceftriaxone MIC	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	> 2
Cefepime 30 μg	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 18	15-17	< 14	≥ 24	21-23	< 21
Cefepime CMI	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32	≤ 1	2-4	> 4
Cefotaxime CMI	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	> 2
Ceftazidime MIC	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2-4	> 4

Valori critici di EUCAST 2012 uguali a quelli di CLSI 2010/12
 Valori critici di EUCAST 2012 più severi rispetto a quelli di CLSI 2010/12

(come il Modified Hodge Test) non sono più strettamente necessari dal momento che tutti i ceppi produttori di carbapenemasi o altri tipi di resistenze sono automaticamente riconosciuti come non sensibili mediante i test di prima intenzione.

In questa situazione, EUCAST e CLSI riconoscono che la determinazione delle carbapenemasi può essere giustificata da considerazioni epidemiologiche e /o da misure di controllo delle infezioni.

Il SAC raccomanda di continuare a ricercare la presenza di carbapenemasi quando i valori di CMI sono superiori ai valori critici di sensibilità almeno per un periodo di 2 anni dall'introduzione della norma EUCAST.

CONCLUSIONI

Le raccomandazioni di CLSI prima del 2010 hanno costituito uno standard internazionale utile ai laboratori svizzeri prima dello sviluppo delle raccomandazioni EUCAST. In Svizzera l'adozione della norma EUCAST e la creazione di un comitato per gli antibiogrammi permettono di unificare le tecniche e l'interpretazione dei test di sensibilità e di confrontare i dati a quelli europei. Inoltre il SAC rappresentato presso EUCAST può partecipare allo sviluppo e al miglioramento delle raccomandazioni. I primi risultati sono incoraggianti, visto che nel 2011 e nei primi 6 mesi del 2012 due terzi dei laboratori svizzeri di microbiologia hanno adottato le raccomandazioni EUCAST.

Tabella 2: Valori critici per ertapenem (mm, CMI), imipenem (mm, CMI) e meropenem (mm, CMI)

Enterobacteriaceae	CLSI 2009			CLSI 2012			EUCAST 2012		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ertapeneme 10µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 22	19-21	< 18	≥ 25	22-24	< 22
Ertapenem CMI	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.5	1	≥ 2	≤ 0.5	1	> 1
Imipenem 10µg	≥ 16	14-15	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	16-21	< 16
Imipenem CMI	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 – 8	> 8
Meropenem 10µg	≥ 16	14-15	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	16-21	< 16
Meropenem CMI	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 – 8	> 8

Valori critici di EUCAST 2012 uguali a quelli di CLSI 2010/12

Valori critici di EUCAST 2012 più severi rispetto a quelli di CLSI 2010/12

Membri del SAC: Jacques Bille, Thomas Bodmer, Marisa Dolina, Olivier Dubuis, Reno Frei, Katja Jatton-Ogay, Laurent Kaiser, Nora Krull, Nadia Liassine, Hanspeter Marti, Kathrin Mühlemann, Vincent Perreten, Jacques Schrenzel, Hans H. Siegrist, Andreas Widmer, Giorgio Zanetti e Reinhard Zbinden

Swissnoso	è pubblicato trimestralmente con il sostegno dell'Ufficio Federale di Sanità Pubblica (OFSP), della Società Svizzera d'Igiene Ospedaliera (SSIO) e della Società Svizzera di Malattie Infettive (SSI).
Redazione	Carlo Balmelli (Lugano), Karim Boubaker (OFSP), Patrick Francioli (Losanna), Kathrin Mühlemann (Berna), Didier Pittet (Ginevra), Pierre-Alain Raeber (OFSP), Christian Ruef (Zurigo), Hugo Sax (Ginevra), Nicolas Troillet (Sion), Andreas F. Widmer (Basilea), Giorgio Zanetti (Losanna)
Impaginazione	Laurent Francioli (Losanna)
Corrispondenza	Prof. Dr. Giorgio Zanetti, CHUV, 1011 Lausanne VD - bulletin@swissnoso.ch
Internet	http://www.swissnoso.ch

Swiss-NOSO controlla rigorosamente il contenuto di ogni volume per assicurare che la scelta ed il dosaggio dei farmaci e di altri prodotti citati sia congruente con le raccomandazioni e la pratica in vigore al momento della pubblicazione. Considerando i progressi continui della ricerca e l'evoluzione della scienza medica, come pure i possibili cambiamenti a livello regolatorio, Swiss-NOSO declina ogni responsabilità in relazione ad eventuali conseguenze legate ad un errore della posologia, dell'applicazione o dell'uso di medicinali o altri prodotti.